

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号
特開2001-165906
(P2001-165906A)

(43) 公開日 平成13年6月22日 (2001.6.22)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テーマコード* (参考)
G 0 1 N 27/447		B 0 1 D 57/02	
B 0 1 D 57/02		C 1 2 M 1/00	A
C 1 2 M 1/00		C 1 2 Q 1/68	A
C 1 2 Q 1/68		G 0 1 N 33/53	D
G 0 1 N 33/53			Z
審査請求 未請求 請求項の数23 O L (全 28 頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号 特願2000-300719(P2000-300719)

(22) 出願日 平成12年9月29日 (2000.9.29)

(31) 優先権主張番号 特願平11-279912

(32) 優先日 平成11年9月30日 (1999.9.30)

(33) 優先権主張国 日本 (J P)

(71) 出願人 000252300

和光純薬工業株式会社

大阪府大阪市中央区道修町3丁目1番2号

(72) 発明者 鷺津 正夫

京都府京都市左京区浄土寺上馬場町119

セラヴィー119-402

(72) 発明者 川端 智久

兵庫県尼崎市高田町6番1号 和光純薬工

業株式会社大阪研究所内

(74) 代理人 100080274

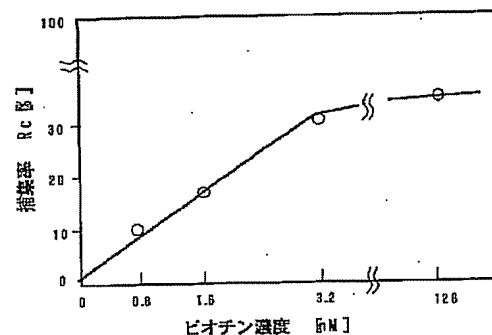
弁理士 稲垣 仁義

(54) 【発明の名称】 誘電泳動力を用いた物質の分離方法

(57) 【要約】

【課題】 2種以上の分子を、誘電泳動力を利用して相互に分離することができる方法を提供する。

【解決手段】 本発明は二つの方法からなり、第一の方法は、試料中の「特定分子」から、該「特定分子」と「特定分子の誘電泳動特性を変化させ得る物質」との複合体物質を形成させ、次いで誘電泳動に付して、該複合体物質と特定分子以外の分子とに分離する方法であり、第二の方法は、誘電泳動力を利用して、2種以上の分子が溶解している溶液を、強電界強度、即ち、電界強度500KV/m以上の不均一電界内に存在せしめることからなる方法である。



【特許請求の範囲】

【請求項1】試料中の「特定分子」から、該「特定分子」と「特定分子の誘電泳動特性を変化させ得る物質」との複合体物質を形成させ、次いで該複合体物質を含む反応物を誘電泳動に付して、該複合体物質と前記試料中に含まれる「特定分子」以外の分子とを分離する方法。

【請求項2】試料中の「特定分子」から、該「特定分子」と「特定分子の誘電泳動特性を変化させ得る物質」との複合体物質を形成させ、次いで該複合体物質を含む反応物を誘電泳動に付して、該複合体物質と前記試料中に含まれる「特定分子」以外の分子とを分離し、分離した前記複合体物質中の「特定分子」若しくは「特定分子」以外の分子を測定する試料中の成分含有量測定方法。

【請求項3】前記「特定分子」が「測定対象分子」であり、前記複合体物質中の「測定対象分子」の含有量を測定する請求項2記載の測定方法。

【請求項4】「特定分子」を含む試料と、「特定分子と結合する物質」と、「特定分子の誘電泳動特性を変化させ得る物質」とを接触させ、次いで得られた「特定分子」と「特定分子と結合する物質」と「特定分子の誘電泳動特性を変化させ得る物質」との複合体物質を含む反応物を誘電泳動に付して、該複合体物質と前記複合体物質形成に関与しなかった「特定分子と結合する物質」とを分離する方法。

【請求項5】「特定分子」を含有する試料と、「特定分子と結合する物質」と、「特定分子の誘電泳動特性を変化させ得る物質」とを接触させ、次いで得られた「特定分子」と「特定分子と結合する物質」と「特定分子の誘電泳動特性を変化させ得る物質」との複合体物質を含む反応物を誘電泳動に付して、該複合体物質と前記複合体物質形成に関与しなかった「特定分子と結合する物質」とを分離し、分離された前記複合体物質中の「特定分子と結合する物質」を測定し、その結果に基づいて試料中の特定分子の存在の有無を検出することを特徴とする試料中の特定分子の検出方法。

【請求項6】「特定分子」を含有する試料と、「特定分子と結合する物質」と、「特定分子の誘電泳動特性を変化させ得る物質」とを接触させ、次いで得られた「特定分子」と「特定分子と結合する物質」と「特定分子の誘電泳動特性を変化させ得る物質」との複合体物質を含む反応物を誘電泳動に付して、該複合体物質と前記複合体物質形成に関与しなかった「特定分子と結合する物質」とを分離し、分離された前記複合体物質中の「特定分子」若しくは「特定分子と結合する物質」、又は前記複合体物質形成に関与しなかった「特定分子と結合する物質」を測定することを特徴とする試料中の成分含有量測定方法。

【請求項7】「特定分子」を含む試料と、「標識物質により標識された特定分子」と、「特定分子の誘電泳動特

性を変化させ得る物質」とから、「標識された特定分子」と「特定分子の誘電泳動特性を変化させ得る物質」との標識複合体物質を形成させ、次いで誘電泳動に付して、該標識された「特定分子」を含む標識複合体物質と遊離の標識された「特定分子」とを分離し、分離した前記標識複合体物質中の標識された「特定分子」若しくは遊離の標識された「特定分子」を測定する試料中の成分測定方法。

【請求項8】前記「特定分子」を含む試料が、生体由来試料又は該生体由来試料の処理物である請求項1～7のいずれか1項記載の方法。

【請求項9】前記「特定分子の誘電泳動特性を変化させ得る物質」が、前記「特定分子」との結合により、「特定分子」をそれと共存する物質から誘電泳動処理により分離可能ならしめるような誘電泳動特性を「特定分子」に与え得るものである請求項1～8のいずれか1項記載の方法。

【請求項10】前記「特定分子と結合する物質」が、「抗原」－「抗体」間反応、「糖鎖」－「レクチン」間反応、「酵素」－「インヒビター」間反応、「蛋白質」－「ペプチド鎖」間反応又は「染色体又はヌクレオチド鎖」－「ヌクレオチド鎖」間反応により特定分子と結合するものである請求項1～9のいずれか1項記載の方法。

【請求項11】試料中の「特定分子」と複合体物質を形成し得る「特定分子の誘電泳動特性を変化させ得る物質」からなる誘電泳動力を用いた測定キット。

【請求項12】「特定分子と結合する物質」と「特定分子の誘電泳動特性を変化させ得る物質」とからなり、これらの物質が試料中の「特定分子」と複合体物質を形成し得る請求項11記載のキット。

【請求項13】更に、誘電泳動装置を組み合わせる請求項11又は12記載のキット。

【請求項14】2種以上の分子が溶解している溶液を、水平及び垂直方向に不均一電界を形成し得る構造を有する電極に形成させた、電界強度500KV/㎠以上の不均一電界内に存在させることを特徴とする前記2種以上の分子を分離する方法。

【請求項15】「測定対象分子」が溶解した液体試料と「測定対象分子に特異的に結合する物質」が溶解した溶液とを反応させて、当該「測定対象分子」と当該「測定対象分子に特異的に結合する物質」との複合体と反応に関与しなかった当該「測定対象分子と特異的に結合する物質」とが溶解している溶液を得、次いでこの溶液を、水平及び垂直方向に不均一電界を形成し得る構造を有する電極に形成させた、電界強度500KV/㎠以上の不均一電界内に存在せしめ、当該複合体と当該反応に関与しなかった「測定対象分子と特異的に結合する物質」とを分離した後、当該複合体中の「測定対象分子と特異的に結合する物質」を測定し、その結果に基づいて試料中の測定

10

20

30

40

50

対象分子の存在の有無を検出することを特徴とする試料中の測定対象物質の検出方法。

【請求項16】「測定対象分子」が溶解した液体試料と「測定対象分子と特異的に結合する物質」が溶解した溶液とを反応させて、当該「測定対象分子」と当該「測定対象分子と特異的に結合する物質」との複合体と反応に関与しなかった当該「測定対象分子と特異的に結合する物質」とが溶解している溶液を得、次いでこの溶液を、水平及び垂直方向に不均一電界を形成し得る構造を有する電極に形成させた、電界強度500KV/μm以上の不均一電界内に存在せしめ、当該複合体と当該反応に関与しなかった「測定対象分子と特異的に結合する物質」とを分離した後、当該複合体中の「測定対象分子と特異的に結合する物質」又は反応に関与しなかった「測定対象分子と特異的に結合する物質」を測定することを特徴とする試料中の測定対象物質の測定法。

【請求項17】「測定対象分子」を含む試料と、「標識物質により標識された測定対象分子」及び「測定対象分子と特異的に結合する物質」とを反応させて得られる、前記「標識物質により標識された測定対象分子」と前記「測定対象分子と特異的に反応する物質」との複合体、前記「測定対象分子」と前記「測定対象分子と特異的に結合する物質」との複合体及び複合体形成に関与しなかった「標識物質により標識された測定対象分子」とを含んでなる液体を、水平及び垂直方向に不均一電界を形成し得る構造を有する電極に形成させた、電界強度500KV/μm以上の不均一電界内に存在せしめ、前記「標識物質により標識された測定対象分子」と前記「測定対象分子と特異的に結合する物質」との複合体と、複合体形成に関与しなかった「標識物質により標識された測定対象分子」とを分離した後、この複合体中の「標識物質により標識された測定対象分子」又は複合体形成に関与しなかった「標識物質により標識された測定対象分子」を測定し、その結果に基づいて試料中の測定対象分子の量を求める試料中の測定対象分子の測定法。

【請求項18】2種以上の分子が溶解している溶液若しくは前記「測定対象分子」を含む試料が、生体由来試料又は該生体由来試料の処理物である請求項14～16のいずれか1項記載の方法。

【請求項19】前記「測定対象分子と特異的に結合する物質」が、「抗原」－「抗体」間反応、「糖鎖」－「レクチン」間反応、「酵素」－「インヒビター」間反応、「蛋白質」－「ペプチド鎖」間反応又は「染色体又はヌクレオチド鎖」－「ヌクレオチド鎖」間反応により測定対象分子と結合するものである請求項14～16のいずれか1項記載の方法。

【請求項20】前記「測定対象分子」及び「測定対象分子と特異的に結合する物質」の何れか一方が蛋白質であって、他方がペプチド鎖である請求項14～16のいずれか1項記載の方法。

【請求項21】前記「測定対象分子」及び「測定対象分子と特異的に結合する物質」の何れか一方が染色体又はヌクレオチド鎖であって、他方がヌクレオチド鎖、蛋白質又はペプチド鎖である請求項14～16のいずれか1項記載の方法。

【請求項22】前記「測定対象分子」及び「測定対象分子と特異的に結合する物質」の何れか一方が糖質であって、他方が蛋白質又はペプチド鎖である請求項14～16のいずれか1項に記載の方法。

【請求項23】前記「測定対象分子」及び「測定対象分子と特異的に結合する物質」の何れか一方がレクチンであって、他方が糖鎖である請求項14～16のいずれか1項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の利用分野】本発明は、誘電泳動力を利用した2種以上の分子の分離方法に関するものである。

【0002】

【発明の背景】近年、半導体技術の進歩によりフォトリソグラフィ等の微細加工技術によってnmからμm単位での物質加工技術が確立され、現在もその微細加工技術は進歩しつづけている。

【0003】化学・生化学分野に於いては、この微細加工技術を利用して、生体試料からの分析対象成分の抽出（抽出工程）、化学・生化学反応を用いる当該成分の分析（分析工程）、並びにそれに続く分離処理（分離工程）及び検出（検出工程）といった一連の化学的・生化学的分析工程の全てを一辺数cm～数十cmのチップ上に集積化等した極小の分析装置をもちいて行う、微細総分析システム〔Micro Total Analysis System (μ-TAS)、Laboratory on a chip〕と呼ばれる新技術が発展しつつある。

【0004】このμ-TASの手法は、化学的・生化学的分析工程全てを通じて、分析時間の短縮化、使用するサンプル量や化学・生化学反応に必要な試薬量の低減化、分析機器や分析スペースの縮小化に大きく貢献するものと期待されている。

【0005】特に、μ-TASに於ける分離工程については、テフロン（登録商標）やシリカ等を材料として作製された内径1mm以下のキャピラリー（細管）を分離カラムとして使用して高電界中で物質の持つ電荷の差を利用して分離を行うキャピラリー電気泳動法や、同様のキャピラリーを用いてカラム担体と物質との相互作用の差を利用して分離を行うキャピラリーカラムクロマトグラフィー法が開発されている。

【0006】しかしながら、キャピラリー電気泳動法は、分離に高電圧が必要であることや、検出領域でのキャピラリー容量が制約されるため検出感度が低いという問題、更には、チップ上のキャピラリーチップでは、分離のためのキャピラリー長に制約があり、高分子の分離に充分

なキャピラリー長が得られないため、低分子の物質の分離には適しているが高分子の物質の分離には適さないという問題を有している。また、キャピラリーカラムクロマトグラフィー法は、分離処理の高速化に限界があり、処理時間の短縮化が困難であるという問題を有している。

【0007】そこで、近年、上記した如き問題を解決する手段の一つとして、物質を不均一な電界内に置くと、物質内に正と負の分極が起こり、物質が移動する力が働く現象、いわゆる誘電泳動力 [H.A.Pohl: "Dielectrophoresis", Cambridge Univ.Press (1978)、T.B.Jones: "Electromechanics of Particles", Cambridge Univ. Press (1995)等] を利用した分離方法が、注目されている。

【0008】この分離方法は、(1) 誘電泳動力の大きさは、物質(粒子)の大きさ・誘電的性質に依存し、電界傾度 に比例するため、微細加工電極を用いれば、電界および電界傾度をきわめて大きくとることができるので、キャピラリー電気泳動のように高電圧を必要とせず、低い印加電圧で高速な分離が可能である、(2) 電界の強い場所が微小領域に極限されるため、電界印加による温度上昇も最小限にとどめることができ、また、高電界場の形成が可能となる、(3) 誘電泳動は、電界傾度 に比例する力であることからわかるように、印加電圧の極性に依存しないので、交流電界下でも直流同様に力が働く。従って、高周波交流を用いれば水溶液での電極反応(電気分解反応)は抑えられるので、電極自体をチャンネル(サンプル流路)中に集積化することが可能となる、(4) キャピラリー電気泳動のように検出部分のチャンネル容量に制約がないことから検出感度の向上も望める、等の点から、現在では μ -TASに於ける最も適した分離方法と考えられている。

【0009】一方、上記した如き誘電泳動力を利用した分離方法として、現在までに種々の方法が報告されている [M. Washizu, et al., IEEE Transaction IA, Vol.30, No.4 p.835-843 (1994)、M. Washizu, et al., Conf. Rec. The Institute of Electrostatics Japan, '93 Ann. Meet. (Int'l Session), p27-32 (1993)、Y. Huang, et al., Biophys. J., Vol.73, p.1118-1129 (1997)及びN.G. Green et al., J. Phys. D.: Appl. Phys., Vol31, 25-30 (1998)等]。

【0010】例えば、ジャーナル オブ フィジックス D, プリティッシュ ジャーナルオブ アプライド フィジックス (J. Phys. D: Appl. Phys.) 27, 2659-2662(1994)には、HL-60細胞と、正常の血液細胞とを含有する懸濁液から、夫々の細胞を分離し得ることが、マイクロバイオリジー, 140, 585-591(1994)には、各種微生物を含有する懸濁液から、酵母や細菌種の違いにより微生物を分離し得ることが、ジャーナルオブバイオテクノロジー, 32, 29-37(1994)には、酵母の生菌と死菌とを含有する懸濁液から、両者を分離し得ることが、ま

た、J. Phys. D: Appl. Phys., 31, 25-30(1998)には、直径93nmのラテックス粒子と216nmのラテックス粒子とを含有する懸濁液から、両者を誘電泳動力及び電気流体力により分離し得ることが夫々報告されている。

【0011】また、M. Washizu, et al., IEEE Transaction IA, Vol.30, No.4 p.835-843(1994)には、単一の生体成分を含む溶液を試料として用い、当該成分が誘電泳動力により電極に捕集されること [例えばアビジン (68kDa), コンカナバリンA (52kDa), キモトリプシンノーゲンA (25kDa) 又はリボヌクレアーゼA (13.7kDa)]、並びに単一の生体成分を含む溶液を試料として用い、当該成分を誘電泳動力により捕集し得ること [4.8.5kbDNA単独試料を用いた場合の捕集率100%、15kbDNA単独試料を用いた場合の捕集率約60%、9 kb環状DNA単独試料を用いた場合の捕集率約50%、アビジン (68kDa) 単独試料を用いた場合の捕集率数%] が報告されている。

【0012】しかしながら、上記した如き従来の誘電泳動力を利用した分離方法についての報告は、各種細胞やラテックス粒子といった、DNAやタンパク等に比べて溶液への溶解性が極めて低い粒子の分離、或いは単一(1種類)のDNAやタンパクの単なる捕集に限られており、2種以上の分子、特に、例えばDNAやタンパク等の生体成分分子が溶解している溶液からの、夫々の分子の分離を行うことの報告は未だなされていない。

【0013】これは、誘電泳動力の強さは、物質の持つ物理的な大きさに依存し、大きな体積を持つ物質ほど大きな誘電泳動力を受けるため、細胞やラテックス粒子に比べてその物理的大きさが非常に小さいタンパクやDNA等の、2種以上の分子が溶解している溶液から、誘電泳動力を利用して夫々の分子の大きさの違いに基づいて、これらを相互に分離することは困難であると考えられていたためであることと、従来は、電界強度500KV/mよりも弱い電界強度で分離していたので、分離できなかったからである。

【0014】

【発明が解決すべき課題】本発明は、上記した如き状況に鑑みなされたもので、2種以上の分子を、誘電泳動力を利用して相互に分離することができる方法を提供することにある。

【0015】

【課題を解決するための手段】本発明は、上記課題を解決する目的でなされたものであり、下記二種類の方法によって、従来できなかった2種以上の分子を、誘電泳動力を利用して相互に分離することに初めて成功したものである。

【0016】第一の方法は、「特定分子」を含有する試料と『そこに含まれる「特定分子」と結合する「特定分子」の誘電泳動特性を変化させ得る物質』とを接触させて、これらの複合体物質を形成させることによって、該

特定分子と特定分子以外の分子とを分離することからなるものであり、従来、誘電泳動力による分離方法において、このような複合体物質を形成させることによって、分離を促進させることは全く行われていないし、このような発想も全く知られていない。

【0017】第二の方法は、2種以上の分子、特に、例えばDNAやタンパク等の、生体成分分子が溶解している溶液を、強電界強度、即ち、電界強度500KV/μm以上の不均一電界内に存在せしめることとなるものであり、このような方法により夫々の分子を相互に分離し得るとい

うことはこれまで知られていない新規な知見である。

【0018】即ち、本発明は、(1)(a)試料中の「特定分子」と「特定分子の誘電泳動特性を変化させ得る物質」との複合体物質を含む反応物を誘電泳動に付して、該複合体物質と前記試料中に含まれる「特定分子」以外の分子とを分離する方法、及び、

【0019】前記複合体物質中の「特定分子」若しくは複合体形成に関与しない「特定分子」以外の分子を測定する方法、

【0020】(b)試料中の「特定分子」と、「特定分子と結合する物質」と、「特定分子の誘電泳動特性を変化させ得る物質」との複合体物質を含む反応物を誘電泳動に付して、該複合体物質と前記複合体物質形成に関与しなかった「特定分子と結合する物質」とを分離する方法、

【0021】(c)かくして分離された前記複合体物質中の「特定分子と結合する物質」を測定し、その結果に基づいて試料中の特定分子の存在の有無を検出することを特徴とする試料中の特定分子の検出方法、及び前記分離された前記複合体物質中の「特定分子」若しくは「特定分子と結合する物質」、或いは前記複合体物質形成に関与しなかった「特定分子と結合する物質」を測定することを特徴とする試料中の成分含有量測定方法、

【0022】(d)「特定分子」を含有する試料と、「標識物質により標識された特定分子」と、「特定分子の誘電泳動特性を変化させ得る物質」とを接触させて、これら「標識された特定分子」と「特定分子の誘電泳動特性を変化させ得る物質」との標識複合体物質を形成させ、次いで誘電泳動に付して、該標識された「特定分子」を含む標識複合体物質と遊離の標識された「特定分子」とを分離し、分離した前記標識複合体物質中の標識された「特定分子」若しくは遊離の標識された「特定分子」を測定し、その結果に基づいて試料中の成分の量を求める試料中の成分含有量測定方法、並びに

【0023】(e)これら(a)～(d)の方法に用いられる測定キットであって、試料中の「特定分子」と複合体物質を形成し得る「特定分子の誘電泳動特性を変化させ得る物質」からなる誘電泳動を利用した測定キットに関する。

【0024】更に、本発明は、(2)2種以上の分子が溶解している溶液を、不均一電界を形成し得る構造を有

する電極に形成させた、電界強度500KV/μm以上の不均一電界内に存在させることを特徴とする前記2種以上の分子を分離する方法、

【0025】並びにこの分離方法を利用した測定対象分子の測定方法、より詳しくは、「測定対象分子」が溶解した液体試料と「測定対象分子に特異的に結合する物質」が溶解した溶液とを反応させて、当該「測定対象分子」と当該「測定対象分子に特異的に結合する物質」との複合体と反応に関与しなかった当該「測定対象分子と特異的に結合する物質」とが溶解している溶液を得、次いでこの溶液を、水平及び垂直方向に不均一電界を形成し得る構造を有する電極に形成させた、電界強度500KV/μm以上の不均一電界内に存在せしめ、当該複合体と当該反応に関与しなかった「測定対象分子と特異的に結合する物質」とを分離した後、当該複合体中の「測定対象分子と特異的に結合する物質」を測定し、その結果に基づいて試料中の測定対象分子の存在の有無を検出することを特徴とする試料中の測定対象物質の検出方法、及び「測定対象分子」が溶解した液体試料と「測定対象分子に特異的に結合する物質」が溶解した溶液とを反応させて、当該「測定対象分子」と当該「測定対象分子と特異的に結合する物質」との複合体と反応に関与しなかった当該「測定対象分子と特異的に結合する物質」及び前記試料中の「測定対象分子」とが溶解している溶液を得、次いでこの溶液を、水平及び垂直方向に不均一電界を形成し得る構造を有する電極に形成させた、電界強度500KV/μm以上の不均一電界内に存在せしめ、当該複合体と当該反応に関与しなかった「測定対象分子と特異的に結合する物質」とを分離した後、当該複合体中の「測定対象分子と特異的に結合する物質」又は反応に関与しなかった「測定対象分子と特異的に結合する物質」を測定することを特徴とする試料中の測定対象分子の測定法、並びに

【0026】「測定対象分子」を含む試料と、「標識物質により標識された測定対象分子」及び「測定対象分子と特異的に結合する物質」とを反応させて得られる、前記「標識物質により標識された測定対象分子」と前記「測定対象分子と特異的に反応する物質」との複合体、前記「測定対象分子」と前記「測定対象分子と特異的に結合する物質」との複合体及び複合体形成に関与しなかった「標識物質により標識された測定対象分子」とを含んでなる液体を、水平及び垂直方向に不均一電界を形成し得る構造を有する電極に形成させた、電界強度500KV/μm以上の不均一電界内に存在せしめ、前記「標識物質により標識された測定対象分子」と前記「測定対象分子と特異的に結合する物質」との複合体と、複合体形成に関与しなかった「標識物質により標識された測定対象分子」とを分離した後、この複合体中の「標識物質により標識された測定対象分子」又は複合体形成に関与しなかった「標識物質により標識された測定対象分子」を測定

し、その結果に基づいて試料中の測定対象分子の量を求める試料中の測定対象分子の測定法に関する。

【0027】

【発明の実施の形態】次に、本発明の実施の形態を説明する。

【0028】誘電泳動力とは、以下に示す如き現象により生じる力である。

【0029】即ち、電界内に置かれた中性分子には、図1に示すように電界の下流側に正極性の分極電荷 $+q$ が、上流側には負極性の分極電荷 $-q$ が夫々誘導され、 $+q$ には電界 E により大きさ $+qE$ の力が働き、この部分を電界の下流側へと引くのに対し、 $-q$ には電界 E により大きさ $-qE$ の力が働き、この部分を電界の上流へと引く。分子が中性ならば、 $+q$ と $-q$ の絶対値は等しく、もし電界が場所によらず一定であるならば、両者に働く力は釣り合っ分子は動かない。しかし、電界が一樣でない場合を図1に示すが、この場合には、強い電界側へ引く力の方が大きくなり、分子は電界の強い側へと駆動されることとなる。このように不均一な電界内で中性粒子が移動する現象を誘電泳動 (Dielectrophoresis, DEP) と呼び、この際に分子に働く力を誘電泳動力と呼ぶ。尚、分子が荷電分子である場合は、該誘電泳動力に加えて、電気泳動力を併せた移動様式となる。

【0030】本発明が適用される試料としては、例えば血清、血漿、髄液、滑液、リンパ液等の体液、又は尿、糞便のような排泄物等の生体由来試料及びその処理物等が挙げられる。また、処理物としては、例えばこれら生体由来試料を水や緩衝液等で適宜希釈等したもの、或いはこれら生体由来試料に由来する後述する如き分子を水や緩衝液等に適宜溶解又は懸濁させ、再構成して得られたもの等が挙げられる。尚、本発明に係る試料には、化学的に合成された上記した如き分子を含有するものも包含される。

【0031】本発明第一の方法(態様①)は、これら試料中の特定の分子を共存するその他の分子と分離し、更にはその分離された分子を測定する方法並びにそれら方法に使用するキットに関するものである。

【0032】かかる本発明の態様としては、(a)「試料中の特定分子」と「特定分子」と結合する「特定分子の誘電泳動特性を変化させ得る物質」との複合体を形成させることを特徴とするもの、(b)「試料中の特定分子」と「特定分子と結合する物質」と、該「特定分子」と結合する「特定分子の誘電泳動特性を変化させ得る物質」との複合体を形成させることを特徴とするもの、及び(c)試料中の「特定分子」と「標識された特定分子」の何れかと、「特定分子」と結合する「特定分子の誘電泳動特性を変化させ得る物質」との複合体を形成させることを特徴とするもの等が含まれる。

【0033】これらの各態様において、「特定分子」としては試料中の分子の中の測定したい分子(測定対象分

子と略称することがある)と測定したい分子以外の分子(測定対象外分子と略称することがある)が含まれる。

【0034】特定分子(測定対象分子)としては、例えばヌクレオチド鎖(オリゴヌクレオチド鎖、ポリヌクレオチド鎖)、染色体、ペプチド鎖(例えばC-ペプチド、アンジオテンシンI等)、蛋白質(例えば免疫グロブリンA(IgA)、免疫グロブリンE(IgE)、免疫グロブリンG(IgG)、 β_2 -ミクログロブリン、アルブミン、フェリチン等の血清蛋白質、例えばアミラーゼ、アルカリホスファターゼ、 γ -グルタミルトランスフェラーゼ等の酵素蛋白、例えばルペラウイルス、ヘルペスウイルス、肝炎ウイルス、ATLウイルス、AIDSウイルス等のウイルスに対する抗ウイルス抗体やこれらウイルスに由来する抗原性物質、例えば各種アレルゲンに対する抗体、例えばリポ蛋白質等の脂質、例えばトリプシン、プラスミン、セリンプロテアーゼ等のプロテアーゼ等)、糖鎖(例えば α -フェトプロテイン、CA19-9、前立腺特異抗原、癌胎児性抗原、癌細胞の産生する特殊な糖鎖を有する物質等有する糖鎖)、レクチン(例えばコンカナバリンA、レンズマメレクチン、インゲンマメレクチン、ダツラレクチン、小麦胚芽レクチン等)等が挙げられる。

【0035】また、いわゆるアイソザイムやホルモン等の同一の作用を有する2種以上の物質が存在する分子又は類似した構造を有するが異なる作用を有する2種以上の物質が存在する分子、例えばアミラーゼ、アルカリホスファターゼ、酸性ホスファターゼ、 γ -グルタミルトランスフェラーゼ(γ -GTP)、リパーゼ、クレアチンキナーゼ(CK)、乳酸脱水素酵素(LDH)、グルタミン酸オキザロ酢酸トランスアミナーゼ(GOT)、グルタミン酸ピルビン酸トランスアミナーゼ(GPT)、レニン、プロテインキナーゼ、チロシンキナーゼ等の酵素類、例えばステロイドホルモン、ヒト絨毛性ゴナドトロピン(hCG)、プロラクチン、甲状腺刺激ホルモン(TSH)、黄体形成ホルモン(LH)等の生理活性物質、例えば前立腺特異抗原(PSA)、 α^2 -マクログロブリン、癌胎児性抗原(CEA)、 α -フェトプロテイン等の癌関連抗原等も特定分子(測定対象分子)に包含される。

【0036】本発明に於ける「誘電泳動特性を変化させ得る物質」(分離向上物質と略称することがある。)としては、特定分子(測定対象分子)と結合して、特定分子との複合体を形成することによって、当該特定分子と、それ以外の共存物質(測定対象外分子、例えば、該複合体の形成に関与しなかった1種又はそれ以上の物質)が誘電泳動操作に対応する挙動に差を生ぜしめ得る物質、即ち、1)例えばこれら両者の何れか一方のみが誘電泳動電極に捕捉され他方が捕捉されないという結果を生ぜしめ得る物質、より具体的には、例えば後述するように電界により分子に発生する誘電泳動力と分子の移動との相互作用によって分離を行う、いわゆる誘電泳動

クロマトグラフィー装置 (Field Flow Fractionation装置) を用いる場合等に於いて、「特定分子」と、それ以外の共存物質との移動速度に変化をもたらし得る物質、より好ましくは何れか一方のみが電極上に補足され、それ以外の共存物質は電極に補足されず誘電泳動電極上に素通りさせ得る物質、或いは2) 両者の何れか一方が負の誘電泳動力を受け、他の一方が正の誘電泳動力を受けるといふ結果を生ぜしめ得る物質、より具体的には、例えば特定分子のみを誘電泳動電極上の特定の位置に集合させ得る物質、より好ましくは何れか一方を正の誘電泳動力によって誘電泳動電極上の電界強度の強い領域に集合させ、他方を負の誘電泳動力によって誘電泳動電極上の電界強度の弱い領域に集合させ得る物質等が含まれる。

【0037】かかる物質としては、例えばシリカ、アルミナ等の無機金属酸化物、例えば金、チタン、鉄及びニッケル等の金属及び、無機金属酸化物等にシランカップリング処理等の操作で官能基を導入したもの、例えば各種微生物、真核生物細胞等の生物、例えばアガロース、セルロース、不溶性デキストラン等の多糖類、例えばポリスチレンラテックス、スチレン-ブタジエン共重合体、スチレン-メタクリル酸共重合体、アクロレイン-エチレングリコールジメタクリレート共重合体、スチレン-スチレンスルホン酸ラテックス、ポリアクリルアミド、ポリグリシジルメタクリレート、ポリアクロレイン被覆粒子、架橋ポリアクリロニトリル、アクリル酸またはアクリル酸エステル系重合体、アクリロニトリル-ブタジエン、塩化ビニル-アクリル酸エステル、ポリ酢酸ビニル-アクリレート等の合成高分子化合物、例えば赤血球、糖、核酸、タンパク質、脂質等の生体分子等が挙げられる。

【0038】これらの物質は通常微粒子乃至粒状のかたちで使用される。

【0039】本発明に使用する「特定分子と結合する物質」というのは、試料中の「特定分子」から、該「特定分子」と「特定分子と結合する物質」と「特定分子の誘電泳動特性を変化させ得る物質」との複合体物質を形成し得、「特定分子以外の分子」と「特定分子と結合する物質」と「特定分子の誘電泳動特性を変化させ得る物質」との複合体物質は実質的に形成しないものであれば良く、特に限定されない。要するに、「特定分子」以外の分子と結合しても上記三者の複合体物質を形成しなければ良いが、実際には「特定分子と特異的に結合する物質」を使用するのが好ましい。

【0040】「特定分子と結合する物質」としては、例えば「抗原」-「抗体」間反応、「糖鎖」-「レクチン」間反応、「酵素」-「インヒビター」間反応、「タンパク質」-「ペプチド鎖」間反応又は「染色体又はヌクレオチド鎖」-「ヌクレオチド鎖」間反応等の相互反応によって「特定分子」と結合するもの等を言い、上記

各組合せに於いて何れか一方が特定分子 (測定対象分子) である場合、他の一方がこの「特定分子 (測定対象分子) と結合する物質」である。例えば、特定分子 (測定対象分子) が「抗原」であるときは「特定分子 (測定対象分子) と結合する物質」は「抗体」であり、特定分子 (測定対象分子) が「抗体」であるときは「特定分子 (測定対象分子) と結合する物質」は「抗原」である (以下、その他の上記各組合せにおいても同様である)。

10 【0041】尚、これら「特定分子 (測定対象分子) と結合する物質」は、少なくとも「特定分子」に結合するものであればよく、必ずしも「特定分子」のみに特異的に結合するものである必要はないが、「特定分子 (測定対象分子) と結合する物質」が、「特定分子」と特異的に結合するものではない場合、組み合わせて用いられる「特定分子の誘電泳動特性を変化させ得る物質」は、「特定分子」に特異的に結合するか、若しくは「特定分子」が「特定分子 (測定対象分子) と結合する物質」との複合体物質が形成されたことによって新たに生じる部位に特異的に結合する性質を有するものである。

20 【0042】また、これら「特定分子 (測定対象分子) と結合する物質」としてはそれ自身が何らかの方法により測定 (検出) 可能であるか、又は標識物質により標識可能なものが一般的である。このような性質のものを用いることによって試料中の特定分子 (測定対象分子) を測定 (検定) することが可能となる。尚、特定分子 (測定対象分子) 自身が何らかの方法により検出可能なものである場合 (例えば酵素等)、或いは特定分子 (測定対象分子) が、「特定分子と結合する物質」を用いずに (介さずに) 直接標識物質と結合し得るものである場合には、該「特定分子と結合する物質」が上記した如き性質を有していなくても、或いは「特定分子と結合する物質」自体を用いなくとも、試料中の特定分子 (測定対象分子) を測定 (検出) することができる。それら自身が何らかの方法により検出可能なものの例としては、酵素、色素、蛍光物質、発光物質、紫外部に吸収を有する物質等がある。

40 【0043】本発明に於いて用いられる標識物質としては、酵素免疫測定法 (EIA)、放射免疫測定法 (RIA)、蛍光免疫測定法 (FIA)、ハイブリダイゼーション法等、通常この分野で用いられるものであればよく、例えばアルカリホスファターゼ (ALP)、 β -ガラクトシダーゼ (β -Gal)、パーオキシダーゼ (POD)、マイクローパーオキシダーゼ、グルコースオキシダーゼ (GOD)、グルコース-6-リン酸脱水素酵素 (G6PDH)、リンゴ酸脱水素酵素、ルシフェラーゼ等の酵素類、例えばクーマシーブリリアントブルーR250、メチルオレンジ等の色素、例えば^{99a}Tc、¹³¹I、¹²⁵I、¹⁴C、³H、³²P、³⁵S、等の放射性同位元素、例えばフルオレセイン、ローダミン、ダンシル、フルオレスカミ

ン、クマリン、ナフチルアミン或はこれらの誘導体、ユウロピウム (Eu) 等の蛍光性物質、例えばルシフェリン、イソルミノール、ルミノール、ビス(2,4,6-トリフロロフェニル) オキサレート等の発光性物質、例えばフェノール、ナフトール、アントラセン或はこれらの誘導体等の紫外部に吸収を有する物質、例えば4-アミノ-2, 2,6,6-テトラメチルピペリジン-1-オキシル、3-アミノ-2,2,5,5-テトラメチルピロリジン-1-オキシル、2,6-ジ-*t*-ブチル- α -(3,5-ジ-*t*-ブチル-4-オキシ-2,5-シクロヘキサジエン-1-イリデン)-*p*-トリルオキシル等のオキシ

10

ル基を有する化合物に代表されるスピンラベル化剤としての性質を有する物質等が挙げられる。
【0044】標識物質により、特定分子(測定対象物質)又は「特定分子と結合する物質」を標識するには、通常この分野で用いられる常法、例えば自体公知のEIA、RIA、FIA或いはハイブリダイゼーション法等に於いて一般的に行われている自体公知の標識方法[例えば、医化学実験講座、第8巻、山村雄一監修、第1版、中山書店、1971; 図説 蛍光抗体、川生明著、第1版、(株)ソフトサイエンス社、1983; 酵素免疫測定法、石川栄治、河合忠、宮井潔編、第3版、医学書院、1987、モレキュラー クローニング ア ラボラトリー マニュアル セカンド エディション、J. サンプルック、E. F. フリッシュ、T. マニアティス、コールド スプリング ハーバー ラボラトリー プレス等]や、アビジン(又はストレプトアビジン)とビオチンの反応を利用した常法等何れの方法により行ってもよい。

20

【0045】前記(a)の態様において、「試料中の特定分子」と「特定分子の誘電泳動特性を変化させ得る物質」との複合体を形成させるには、「特定分子」を含有する試料及び「特定分子の誘電泳動特性を変化させ得る物質」を、それぞれ例えば水あるいは緩衝液、例えばトリス(ヒドロキシメチルアミノメタン)緩衝液、グッド緩衝液、リン酸緩衝液、ホウ酸緩衝液等、に溶解、分散若しくは懸濁させて液状物とし、これら液状物を互いに混合接触させればよい。尚、これらそれぞれの液状物を先ず調整して一挙にこれらを混合してもよい。また、「特定分子」を含有する試料が液状物である場合には、該試料に、直接「特定分子の誘電泳動特性を変化させ得る物質」を混合させてもよい。

30

【0046】本発明の前記態様(b)及び(c)における複合体の形成も上記と同様にして行われる。

【0047】即ち、上記(b)の態様においては、「試料中の特定分子」と「特定分子と結合する物質」と「特定分子の誘電泳動特性を変化させ得る物質」との複合体を形成させるには、「特定分子」を含有する試料、「特定分子と結合する物質」及び「特定分子の誘電泳動特性を変化させ得る物質」を、それぞれ例えば水あるいは緩衝液、例えばトリス(ヒドロキシメチルアミノメタン)緩衝液、グッド緩衝液、リン酸緩衝液、ホウ酸緩衝

50

液等、に溶解、分散若しくは懸濁させて液状物とし、これら液状物を互いに混合接触させればよい。尚、これらそれぞれの液状物を先ず調整して一挙にこれらを混合してもよく、また、先ず「特定分子と結合する物質」と「特定分子の誘電泳動特性を変化させ得る物質」との複合体を上記と同様にして形成させ、この複合体を含有する液状物をさらに上記の様に液状物とした特定分子含有試料とを混合接触させても良い。更にまた、「特定分子」を含有する試料と「特定分子の誘電泳動特性を変化させ得る物質」とを接触させてこれらの複合体を形成させ、更にこれに「特定分子と結合する物質」を接触させてもよい。

【0048】尚、「特定分子」を含有する試料が液状物である場合には、上記したように例えば水或いは緩衝液等に溶解、分散若しくは懸濁させなくともよい。

【0049】また、上記(c)の態様においては、「試料中の特定分子」又は「標識により標識された特定分子」と「特定分子の誘電泳動特性を変化させ得る物質」との複合体を形成させるには、先ず、「特定分子」を含有する試料及び「標識により標識された特定分子」を、それぞれ例えば水あるいは緩衝液、例えばトリス(ヒドロキシメチルアミノメタン)緩衝液、グッド緩衝液、リン酸緩衝液、ホウ酸緩衝液等、に溶解、分散若しくは懸濁させて液状物とし、これら液状物を互いに混合接触させる。次いでこの混合液状物と、「特定分子の誘電泳動特性を変化させ得る物質」を例えば水あるいは緩衝液、例えばトリス(ヒドロキシメチルアミノメタン)緩衝液、グッド緩衝液、リン酸緩衝液、ホウ酸緩衝液等に溶解、分散若しくは懸濁させた液状物とを互いに混合接触させればよい。尚、これらそれぞれの液状物を先ず調整して一挙にこれらを混合してもよい。

【0050】尚、「特定分子」を含有する試料が液状物である場合には、上記したように例えば水或いは緩衝液、例えばトリス(ヒドロキシメチルアミノメタン)緩衝液、グッド緩衝液等に溶解、分散若しくは懸濁させなくともよい。

【0051】かくして得られた、複合体含有液状物を次に誘電泳動に付す。

【0052】(誘電泳動力の一般式) 等価双極子法(Equivalent dipole moment method)は誘導電荷を等価的な電気双極子に置き換えて、誘電泳動力を解析する手法である。これによれば、電界Eの中に置かれた半径aの球体粒子に働く誘電泳動力F_dは、

$$F_d = 2\pi a^3 \epsilon_m R_e [K^*(\omega)] \nabla(E^2) \quad (1)$$

で与えられる。ここで

【外1】

$$K^*(\omega)$$

は、 ω ：印加電圧の角周波数、 j ：虚数単位を用いて、

【数2】

$$K^*(\omega) = \varepsilon_p^* - \varepsilon_m^* / \varepsilon_p^* + 2\varepsilon_m^* \quad (2)$$

$$\varepsilon_p^* = \varepsilon_p - j\sigma_p / \omega, \quad \varepsilon_m^* = \varepsilon_m - j\sigma_m / \omega \quad (3)$$

ただし、

【外2】

$$\varepsilon_p, \varepsilon_m, \sigma_p, \sigma_m$$

は粒子と溶液の誘電率と導電率であり、上の式で複素量には $*$ をつけた。

【0053】式(1)は

【数4】

$$\text{Re}[K^*(\omega)] > 0$$

であれば粒子を電界が強い方へと引き付ける力が働く（正の誘電泳動、PositiveDEP）、

【数5】

$$\text{Re}[K^*(\omega)] < 0$$

であれば粒子を電界の弱い方へと押しやる力が働く（負の誘電泳動力、NegativeDEP）ことを示している。

【0054】上記誘電泳動力の一般式から、誘電泳動力を受ける物質の誘電泳動力に関与するパラメーターは、概ね物質及び媒質の誘電率及び導電率、物質の持つ大きさ、印可する電界の周波数であることがわかる。これらのパラメーターは検出複合体物質が結合した分離向上物質と特定分子（測定対象分子）の検出に用いられる標識分子の種類により適宜設定すべきものであり一概には言えないが、用いられる媒質の導電率は通常13mS/cm（PBS濃度とした）以下、好ましくは1mS/cm以下である。分離向上物質の大きさは粒子の場合通常その平均粒子径が1μm以下、好ましくは0.025～100μmであり、生体分子としてはその大きさが通常10nm以上（通常のタンパク分子が数～数十nmということから類推）、好ましくは500nm以上である。

【0055】（分離向上物質を用いた誘電泳動分離に使用する電界）上記誘電泳動力の一般式から、印加する電界の誘電泳動力に関与するパラメーターは印加電界強度及び印加周波数であると言える。特に同一物質であっても印加する周波数によって正負の誘電泳動特性が変化することがあるから、特定分子（測定対象分子）に応じて適宜設定されるものである。これらのパラメーターは検出複合体物質が結合した分離向上物質と特定分子（測定対象分子）の検出に用いられる標識分子の種類により適宜設定すべきものであり一概には言えないが、誘電泳動分

*【数3】

離向上物質が正の誘電泳動を示す場合、印加電界強度は通常3.5MV/m以下、好ましくは1.0MV/m以下である。分離向上物質が負の誘電泳動を示す場合では、3.5MV/m以下の電界強度である。印加周波数は通常100Hz～10MHz、好ましくは1kHz～10MHzである。

【0056】尚、本発明に於いて印加する電界は、直流電界及び交流電界のいずれでも良いが、交流電界が好ましい。

【0057】（誘電泳動分離向上物質を用いた分離法）分離向上物質を用いた特定分子の分離法としては、以下の2つに大別される。

【0058】（分離法－1）第1に、分離向上物質が特定分子以外の分子（測定対象外分子）〔例えば特定分子の検出に用いられる遊離の標識物質等〕と同一の正又は負の誘電泳動力を示すものであって、特定分子以外の分子（測定対象外分子）よりも大きな誘電泳動力を示す物質である場合、実質的に分離向上物質及び分離向上物質に結合した特定分子のみが大きな誘電泳動力を受けて分離されることとなる。

【0059】即ち、（1）例えば、分離向上物質及び分離向上物質に結合した分子は誘電泳動力によって誘電泳動電極上の特定の部分に集合するが、特定分子以外の分子（測定対象外分子）〔例えば特定分子の検出に用いられる遊離の標識物質等〕は集合しないような電界強度及び媒質条件を適宜設定して、これら特定分子と特定分子以外の分子を分離することができる。

【0060】また、（2）例えば後述するように電界により分子に発生する誘電泳動力と分子の移動との相互作用によって分離を行う、いわゆる誘電泳動クロマトグラフィ装置（Field Flow Fractionation装置）を用いて分離を行ってもよい。この場合には、分離向上物質及び分離向上物質に結合した分子のみが誘電泳動力によって誘電泳動分離電極上に捕集されるか、又は分離向上物質及び分離向上物質に結合した分子の移動速度とそれ以外の分子移動速度に差が生じるので、これら特定分子を特定分子以外の分子（測定対象外分子）から容易に分離することができる。

【0061】（分離法－2）第2に、分離向上物質が特定分子以外の分子（例えば特定分子の検出に用いられる標識物質）と異なる正又は負の誘電泳動力を示す物質である場合、即ち、分離向上物質が正の誘電泳動力を示し、特定分子以外の分子が負の電気泳動力を示す場合、或いは分離向上物質が負の誘電泳動力を示し、特定分子以外の分子が正の電気泳動力を示す場合、分離向上物質

及び分離向上物質に結合した特定分子と、特定分子以外の分子とは異なる電解領域に夫々移動するので、特定分子を特定分子以外の分子と分離することが出来る。

【0062】即ち、(1)例えば、実質的に分離向上物質及び分離向上物質に結合した特定分子と特定分子以外の分子は、誘電泳動力によって誘電泳動電極上の異なる電解領域に移動するので、特定分子と特定分子以外の分子(例えば特定分子の検出に用いられる遊離の標識物質等)とを分離することができる。

【0063】また、(2)例えば、誘電泳動クロマトグラフィー装置(Field Flow Fractionation装置)を用いて分離を行ってもよく、この場合、分離向上物質及び分離向上物質に結合した特定分子が正の誘電泳動力を示し、特定分子以外の分子が負の誘電泳動力を示す条件に於いては、分離向上物質及び分離向上物質に結合した特定分子は誘電泳動力によって誘電泳動分離電極上に捕集されるが、特定分子以外の分子は負の誘電泳動力によって電極に捕集されない。一方、特定分子以外の分子が正の誘電泳動力を示し、分離向上物質及び分離向上物質に結合した特定分子が負の誘電泳動力を示す条件に於いては、特定分子以外の分子は誘電泳動力によって誘電泳動分離電極上に捕集されるが、分離向上物質及び分離向上物質に結合している特定分子は負の誘電泳動力によって電極に捕集されない。従って、これら特定分子と特定分子以外の分子とを分離することが出来る。

【0064】尚、本発明に於いて用いられる、誘電泳動電極及び誘電泳動クロマトグラフィー装置としては、この分野で通常用いられるものは全て使用可能であるが、具体的には後述するような水平及び垂直方向に不均一電解を形成し得る構造を有する電極及びこれを有するものが挙げられる。

【0065】「分離向上物質」は、通常は「特定分子と結合する物質」に結合させて用いられ、このようにすることによって試料中の「特定分子」に結合させ得るが、例えば分離向上物質表面に官能基を導入した後、この官能基を介して特定分子に結合させる方法、分離向上物質と「特定分子」をリンカーを介して結合させる方法等の化学的結合法等により「特定分子」に直接「分離向上物質」を結合させてもよい。尚、ここで用いられる「特定分子と特異的に結合する物質」としては、先に述べた「特定分子と特異的に結合する物質」と同じもの[但し、それ自身が何らかの方法により測定(検出)可能であるか、又は標識物質により標識可能なものである必要はない。]、或いは「特定分子」が「特定分子と結合する物質」との複合体が形成されたことによって、新たに生じる部位に特異的に結合する性質を有するもの等が用いられる。尚、「特定分子と結合する物質」との複合体が形成されたことによって、新たに生じる部位に特異的に結合する性質を有するものとしては、例えば「特定分子」と「特定分子と結合する物質」との複合体を認識し

てこれに結合し得る抗体、ペプチド鎖、ヌクレオチド鎖等が挙げられる。

【0066】また、「分離向上物質」と「特定分子と結合する物質」とを結合させるには、先に述べた如き標識物質により「特定分子」を標識する方法と同様の方法により行えばよい。

【0067】尚、「分離向上物質」として、直接「特定分子」と特異的に結合し得る性質を有するものを用いる場合には、上記した如き操作は不要である。

【0068】このような「分離向上物質」としては、例えば核酸、タンパク質、脂質等が挙げられる。

【0069】本発明に於いて、『複合体物質と試料中に含まれる「特定分子」以外の分子とを分離する』とは、必ずしも「複合体物質」(特定分子と分離向上物質との複合体物質)のみを分離(単離)することを意味するものではなく、目的に応じて試料中に共存する1種又はそれ以上の「複合体物質」以外の物質と「特定分子」とを分離することを意味する。この場合、適宜条件を設定して本発明の分離方法を繰返し実施すれば、「特定分子」をこれと分離向上物質との複合体物質として単離することが可能である。要は、試料中の「特定分子」若しくは「特定分子」以外の分子の含有量が測定できれば良い。

【0070】上記した如き本発明の分離方法によれば、試料中から「特定分子」(特定分子と分離向上物質との複合体として分取される場合を含む。)又は「特定分子」以外の分子を分取することができる。

【0071】即ち、前記した如き[分離法-1]の

(1)に於いては、例えば特定分子は分離向上物質との複合体として電極の特定部分に捕集され、それ以外の分子は電極の特定部分に捕集されないような条件の電界を印加したまま、通常この分野で用いられる適当な緩衝液又は水等を用いて電極を洗浄することにより特定分子以外の分子が分取でき、次いで、電界の印加を中止して適当な緩衝液又は水等を用いて電極を洗浄すれば、特定分子(特定分子と分離向上物質との複合体)を分取することができる。

【0072】また、前記した如き[分離法-2]の

(1)に於いては、実質的に分離向上物質及び分離向上物質に結合した分子と特定分子以外の分子は、誘電泳動力によって誘電泳動電極上の異なる電解領域に移動するので、これら移動した分子を夫々別々に分取することができる。

【0073】更に、前記した如き[分離法-1]の

(2)の方法で分離を行った場合には、先ず、電極の特定部分に捕集されずに移動してきた小さい誘電泳動力を受ける特定分子以外の分子を含有する移動溶液を分取し、次いで、電界の印加を中止して適当な緩衝液又は水等を用いて電極を洗浄することにより、電荷印加時に電極の特定部分に捕集されていた大きい誘電泳動力を受ける特定分子を移動させて当該分子を含有する洗浄液を分

取すれば、特定分子又はそれ以外の分子を夫々分取することができる。

【0074】また、〔分離法-2〕の(2)の方法で分離を行った場合、分離向上物質及び分離向上物質に結合した特定分子が正の誘電泳動力を示し、特定分子以外の分子が負の誘電泳動力を示す条件に於いては、先ず、電極の特定部分に捕集されずに移動してきた負の誘電泳動力を示す特定分子以外の分子を含有する移動溶液を分取し、次いで、電界の印加を中止して適当な緩衝液又は水等を用いて電極を洗浄することにより、電荷印加時に電極の特定部分に捕集されていた正の誘電泳動力を示す特定分子を移動させて当該分子を含有する洗浄液を分取すれば、特定分子を分取することができる。また、特定分子以外の分子が正の誘電泳動力を示し、分離向上物質及び分離向上物質に結合した特定分子が負の誘電泳動力を示す条件に於いては、先ず、電極の特定部分に捕集されずに移動してきた負の誘電泳動力を示す特定分子を含有する移動溶液を分取し、次いで、電界の印加を中止して適当な緩衝液又は水等を用いて電極を洗浄することにより、電荷印加時に電極の特定部分に捕集されていた正の誘電泳動力を示す特定分子以外の分子を移動させて当該分子を含有する洗浄液を分取すれば、特定分子又はそれ以外の分子を夫々分取することができる。

【0075】尚、用いられる緩衝液としては、例えばトリス(ヒドロキシメチルアミノメタン)緩衝液、グッドの緩衝液、リン酸塩緩衝液、ホウ酸塩緩衝液等、通常この分野で使用されるものが挙げられる。

【0076】尚、上記二者(「特定分子」及び「特定分子の誘電泳動特性を変化させ得る物質」)の複合体物質と「特定分子の誘電泳動特性を変化させ得る物質」とは、誘電泳動によっては通常分離し得ず、また、上記三者(「特定分子」、「特定分子と結合する物質」及び「特定分子の誘電泳動特性を変化させ得る物質」)の複合体物質と、「特定分子と結合する物質」と「特定分子の誘電泳動特性を変化させ得る物質」との複合体物質及び「特定分子の誘電泳動特性を変化させ得る物質」とは、誘電泳動によっては通常分離し得ずないが、分離されなくとも、後述する試料中の「特定分子」の測定には特に支障はない。

【0077】また、試料中の「特定分子」と結合する「特定分子の誘電泳動特性を変化させ得る物質」を「特定分子と結合する物質」との複合体としてではなく、単独で使用する場合は、「特定分子と結合する物質」を過剰量使用するので、「特定分子と結合する物質」が残存するが、これは「特定分子」以外の分子と一緒に分離すれば良い。

【0078】本発明の別の態様(第二の方法:態様②)は、2種以上の分子が溶解している溶液を、不均一電界を形成し得る構造を有する電極に形成させた電界強度500KV/m以上の不均一電界内に存在させ、該2種以上の分

子を相互に分離することに関する。

【0079】以下、この点について詳述する。

【0080】本発明に於いて、電界強度500KV/m以上とすれば、従来分離し得なかった溶液中の2種以上の分子を分離できるが、上記した如き電極に形成させる不均一電界の最適電界強度は、溶液中の2種以上の分子の種類により適宜設定すべきものであり一概には言えないが、500KV/m以上、好ましくは500KV/m~10MV/m、より好ましくは500KV/m~3.5MV/mの範囲から適宜選択される。尚、電界強度を強くすると、発熱により分析が困難となる場合があるが、このような可能性がある場合には、電極部分を適宜冷却する等すればよい。

【0081】尚、本発明に於いて印加する電界は、直流電界及び交流電界のいずれでも良いが、交流電界が好ましい。

【0082】より具体的には、例えば目的とする分子がヌクレオチド鎖(オリゴヌクレオチド、ポリヌクレオチド)、染色体等の場合には、500KV/m以上、好ましくは500KV/m~10MV/m、より好ましくは500KV/m~3.5MV/mであり、また、例えば目的とする分子がペプチド鎖、蛋白質等の場合には、500KV/m以上、好ましくは1MV/m~10MV/m、より好ましくは1MV/m~3.5KV/mである。

【0083】また、当該不均一電界の周波数としては、通常100Hz~10MHz、好ましくは1KHz~10MHzである。

【0084】尚、本発明の態様①にあっては、「特定分子の誘電泳動特性を変化させ得る物質」を含む複合体物質を使用するため分離が促進されるので、500KV/mよりも弱い電界強度であっても、2種以上の分子を分離することができる。しかしながら、より分離し易くなることから、500KV/m以上とするのが好ましい。

【0085】本発明の態様②に於ける2種以上の分子としては、例えばヌクレオチド鎖(オリゴヌクレオチド鎖、ポリヌクレオチド鎖)、染色体、ペプチド鎖(例えばC-ペプチド、アンジオテンシンI等)、蛋白質(例えば免疫グロブリンA(IgA)、免疫グロブリンE(IgE)、免疫グロブリンG(IgG)、 β_2 -ミクログロブリン、アルブミン、フェリチン等の血清蛋白質、例えばアミラーゼ、アルカリホスファターゼ、 γ -グルタミルトランスファラーゼ等の酵素蛋白、例えばルペラウイルス、ヘルペスウイルス、肝炎ウイルス、ATLウイルス、AIDSウイルス等のウイルスに対する抗ウイルス抗体やこれらウイルスに由来する抗原性物質、例えば各種アレルゲンに対する抗体、例えばリポ蛋白質等の脂質、例えばトリプシン、プラスミン、セリンプロテアーゼ等のプロテアーゼ等)、糖鎖(例えば α -フェトプロテイン、CA19-9、前立腺特異抗原、癌胎児性抗原、癌細胞の産生する特殊な糖鎖を有する物質等有する糖鎖)、レクチン(例えばコンカナバリンA、レンズマメレクチン、インゲンマメレクチン、ダツラレク

チン、小麦胚芽レクチン等)等の生体由来成分が挙げられる。本発明の態様②にあっては、2種以上の分子は溶液に溶解し得るものであるが、本発明の態様①にあっては、不溶物であっても差し支えない。

【0086】尚、本発明の態様②によれば、上記した如き分子のうち、同種類であって分子量が異なる2種以上の分子であっても、また、全く異なる2種以上の分子であっても分離可能である。同種類であって分子量が異なる2種以上の分子の組み合わせとしては、例えば、ヌクレオチド鎖(オリゴヌクレオチド、ポリヌクレオチド)、染色体から選ばれる分子の組み合わせや、例えばペプチド鎖、蛋白質から選ばれる分子の組み合わせ等が挙げられる。また、全く異なる2種以上の分子の組み合わせとしては、例えば、ヌクレオチド鎖(オリゴヌクレオチド、ポリヌクレオチド)、染色体から選ばれる分子と、ペプチド鎖、蛋白質から選ばれる分子との組み合わせや、糖質と、ペプチド鎖、蛋白質から選ばれる分子との組み合わせ、或いは糖鎖と、ペプチド鎖、蛋白質、レクチンから選ばれる分子との組み合わせ等が挙げられる。

【0087】上記した如き2種以上の分子が溶解している溶液としては、例えば血清、血漿、髄液、滑液、リンパ液等の体液、又は尿、糞便のような排泄物等の生体由来試料及びその処理物等が挙げられる。また、処理物としては、例えばこれら生体由来試料を水や緩衝液等で適宜希釈したもの、或いはこれら生体由来試料に由来する上記した如き分子を水や緩衝液等に適宜溶解させ、再構成して得られたもの等が挙げられる。尚、本発明に係る2種以上の分子が溶解している溶液には、化学的に合成された上記した如き分子を含有するものも包含される。

【0088】本発明に於いて用いられる緩衝液としては、例えばトリス(ヒドロキシメチルアミノメタン)緩衝液、グッドの緩衝液、リン酸塩緩衝液、ホウ酸塩緩衝液等、通常この分野で使用されるものが挙げられる。

【0089】尚、上記した如き溶液の電導率が高いと、電圧の印加に伴い溶液中に電流が流れることによってジュール熱が発生し、溶液が沸騰する可能性があるため、通常電導率が10mS/cm以下、好ましくは200 μ S/cm以下の範囲となるように適宜調整等して用いるのが好ましい。

【0090】本発明に於いて、水平及び垂直方向に不均一電界を形成し得る構造を有する電極とは、例えばアルミニウム、金等の導電性の材質からなるものであり、その構造は、誘電泳動力、即ち、水平及び垂直方向に不均一電界を生じ得るものであればよく、例えば、インターデジタル形状[J. Phys. D: Appl. Phys. 258, 81-88, (1992)、Biochim. Biophys. Acta., 964, 221-230, (1988)等]が挙げられる。より具体的には、図2に示すように、三角形、方形、台形、正弦波形、或いは鋸歯形等の

形状が好ましく、これらが繰り返し規則的に連続して配置された構造でもよい。尚、特定の分子を分取する目的で使用する場合には、当該繰り返し規則的に連続して配置された構造を有する電極が好ましい。

【0091】このような電極は、通常、例えばガラス、石英、シリコン等の非導電性の材質からなる基板上に、自体公知の微細加工技術[Biochim. Biophys. Acta., 964, 221-230等]を用いて、1対以上の上記した如き形状の電極を櫛歯状に設けることにより作製される。また、隣接(対向)する電極間の距離は、強電界強度の不均一交流電界を形成し得るものであれば特に限定されず、目的の分子の種類により適宜設定すべきものであり一概には言えないが、例えばペプチド鎖、蛋白質等の場合、電極の最大幅同士の距離(最小ギャップ)が、通常10 μ m以下、好ましくは5 μ m以下であり、ヌクレオチド鎖(ポリヌクレオチド、オリゴヌクレオチド)等の場合、通常100 μ m以下、好ましくは50 μ m以下である。また、染色体等の場合、最小ギャップが、通常50 μ m以下、好ましくは10 μ m以下である。尚、隣接(対向)する電極間の距離は、目的の分子に対してあまり広すぎると充分な電界強度の不均一電界を形成することができず、また、狭すぎると目的の分子を捕集し得なくなる場合があるので注意が必要である。

【0092】本発明の態様②の分離方法を実施するには、例えば以下の如く行えばよい。

【0093】〔方法A〕上記した如き電極(電極基板)を用いて形成させた不均一電界内に、2種以上の分子が溶解している溶液を存在させて、当該分子を相互に分離するには、例えば目的とする対象分子のみが誘電泳動力によって移動するような(例えば特定の分子のみが誘電泳動力により電極の特定部分に移動し、電極の特定部分に捕集されるが、それ以外の分子には十分な誘電泳動力が発生せず、電極の特定部分に捕集されないような)電界強度の不均一電界を形成するように条件を適宜設定して不均一電界中に存在する分子の移動様式の違いによって分離してもよいし、また、媒質の誘電率、導電率や印加する電界の周波数を調整して目的とする分子に正の誘電泳動力が、それ以外の分子に負の誘電泳動力が発生するような条件を適宜設定し、電界の強い領域と電界の弱い領域に分子を夫々分離してもよい。

【0094】〔方法B〕上記した如き電極(電極基板)を用いて形成させた不均一電界内に目的とする分子を移動させ、電界により分子に発生する誘電泳動力と分子の移動との相互作用によって分離を行ってもよい。この場合、より強い誘電泳動力を受ける分子は、弱い誘電泳動力を受ける分子よりも遅延して移動するため、分子の分離がより容易に可能となる。

【0095】より具体的には、図3に示すような、前記した如き電極と、当該電極上を2種以上の分子が溶解した溶液が移動できるように設けられた流路とを有する電

極基板を用い、当該電極に電圧を印加しつつ、当該印加により形成された電界強度500KV/m以上の不均一電界内を2種以上の分子が溶解した溶液を移動させればよい。尚、図3に於いて、矢印は2種以上の分子が溶解した溶液が移動する方向を示す。

【0096】即ち、溶液中の分子は、電極上で誘電泳動力により電界のより強い電極近傍へと引き寄せられる。ここで分子の運動は、誘電泳動力 F_d 、流路内の流れによる抗力 F_v 、熱運動による力 F_{th} の3つの要因により支配され、① $F_d >> F_v + F_{th}$ の場合には、分子は電極に捕集（トラップ）され、② $F_d << F_v + F_{th}$ の場合には、電界に関わらず、分子は流路内の流れによって流出する。また、③ $F_d \approx F_v + F_{th}$ の場合には、分子は電極に吸着・脱着を繰り返しながら下流へと運ばれる結果、本来の流路内の流れよりも遅れて出口に到達する。従って、上記①の如き条件下で行えば、大きい誘電泳動力を受ける分子は電極の特定部分に捕集され、それ以外の分子は電極の特定部分に捕集されずに流れてくるので、2種以上の分子を相互に分離することが可能となる。また、上記③の如き条件下で行えば、より大きい誘電泳動力を受ける分子は小さい誘電泳動力を受ける分子よりも流路内での移動速度が遅くなるので、2種以上の分子を相互に分離することが可能となる。

【0097】尚、上記〔方法B〕に於いて、2種以上の分子が溶解した溶液を移動させるには、例えば送流ポンプ等を用いた物理的な媒質の流れを利用してもよい、また、電気浸透流を利用してもよい。

【0098】本発明の態様②の分離方法によれば、2種以上の分子が溶解する溶液中から、目的とする特定の分子を分取することができる。

【0099】即ち、前記した如き本発明に係る分離方法〔方法A〕に於いては、例えば特定の分子は電極の特定部分に捕集され、それ以外の分子は電極の特定部分に捕集されないように2種以上の分子を分離した後、電界を印加したまま、通常この分野で用いられる適当な緩衝液又は水等を用いて電極を洗浄し、次いで、電界の印加を中止して適当な緩衝液又は水等を用いて電極を洗浄すれば、特定の分子又はそれ以外の分子を夫々分取することができる。

【0100】また、前記した如き本発明に係る分離方法〔方法B〕に於いては、例えば前記①の条件下で分離を行った場合には、流路出口に於いて、先ず、電極の特定部分に捕集されずに移動してきた小さい誘電泳動力を受ける分子を含有する移動溶液を分取し、次いで、電界の印加を中止して適当な緩衝液又は水等を用いて電極を洗浄することにより、電荷印加時に電極の特定部分に捕集されていた大きい誘電泳動力を受ける分子を流路出口に移動させて当該分子を含有する洗浄液を分取すれば、特定の分子又はそれ以外の分子を夫々分取することができ、また、前記③の条件下で分離を行った場合には、流

路出口に於いて、先ず、小さい誘電泳動力を受ける分子を含有する移動溶液を分取し、次いでこれより移動速度が遅いより大きい誘電泳動力を受ける分子を含有する移動溶液を分取すれば、特定の分子又はそれ以外の分子を夫々分取することができる。

【0101】本発明の態様①及び②の分離方法により分離された2種以上の分子のうちの一方を、当該分子が有する性質に応じた方法により測定すれば、溶液中の目的とする特定の分子を測定することができる。

【0102】先ず、本発明の態様①の分離方法を利用する場合について述べれば、以下の如くである。

【0103】即ち、特定分子（測定対象分子）と該特定分子と結合する「特定分子の誘電泳動特性を変化させ得る物質」との相互作用の結果生じる複合体物質と、試料中に含まれる特定分子以外の分子との分離を、本発明の態様①の分離方法により行った後、当該複合体物質中の特定分子（測定対象分子）若しくは「特定分子」以外の分子を測定することにより、試料中の成分（測定対象分子）若しくは「特定分子」以外の分子を測定することにより、試料中の成分〔特定分子（測定対象分子）又は／及び特定分子以外の分子〕を測定することができる。

【0104】尚、上記方法に於いて、「特定分子」としてはそれ自体が何らかの方法により測定（検出）可能であるか、又は標識物質により標識可能なもの、或いはそれ自体が測定（検出）可能であるか、標識物質により標識可能な「特定分子と結合する物質」と結合したものである。尚、標識物質、「特定分子と結合する物質」及び標識方法は先に述べた通りである。

【0105】また、特定分子（測定対象分子）と該特定分子と結合する物質と「特定分子の誘電泳動特性を変化させ得る物質」との相互作用の結果生じる複合体物質（複合体物質1）と、複合体物質形成に関与しなかった（遊離の）該特定分子と結合する物質との分離、いわゆるB/F分離を、本発明の態様①の分離方法により行った後、当該複合体物質1、又は複合体物質1中の特定分子（測定対象分子）若しくは「特定分子と結合する物質」、或いは複合体物質形成に関与しなかった（遊離の）該特定分子と結合する物質を測定することにより、試料中の特定分子（測定対象分子）を迅速且つ容易に測定し得る。

【0106】尚、上記方法に於いて、「特定分子と結合する物質」としては、それ自体が何らかの方法により測定（検出）可能であるか、又は標識物質により標識可能な「特定分子と結合する物質」を使用するのが一般的である。

【0107】更に、特定分子（測定対象分子）と該特定分子と結合する物質〔又は標識物質により標識された特定分子と結合する分子〕と「特定分子の誘電泳動特性を変化させ得る物質」とを反応させ生じた特定分子（測定対象分子）と該特定分子と結合する物質〔又は標識物質

により標識された特定分子と結合する分子]と「特定分子の誘電泳動特性を変化させ得る物質」との複合体物質(複合体物質1)と、遊離の特定分子と結合する物質(又は遊離の標識された特定分子と結合する分子)とを、前述した如き本発明の態様①の分離方法により分離する。次いで、分離された複合体物質1を、複合体物質1中の特定分子と結合する物質(又は該複合体物質1中の特定分子と結合する物質に結合した標識物質)の性質に基づいて検出することにより、試料中の特定分子(測定対象分子)の存在の有無を測定することが出来る。

【0108】更に、例えば以下の如き方法によれば、試料中の特定分子(測定対象分子)の存在を測定し得るのみでなく、試料中の特定分子(測定対象分子)の量を定量的に測定し得る。

【0109】即ち、特定分子(測定対象分子)と特定分子と結合する物質(又は標識された特定分子と結合する物質)と「特定分子の誘電泳動特性を変化させ得る物質」との複合体物質(複合体物質1)と、遊離の特定分子と結合する物質(又は遊離の標識された特定分子と結合する物質)とを、前述した如き本発明の態様①の分離方法により分離する。次いで、分離された該複合体物質1中の特定分子と結合する物質(又は該複合体物質1中の特定分子と結合する物質に結合した標識物質)の量、又は遊離の特定分子と結合する物質(又は遊離の標識された特定分子と結合する物質に結合した標識物質)の量を、特定分子と(特異的に)結合する物質又は標識物質の性質に応じた測定方法により求め、これらの量に基づいて、試料中の特定分子(測定対象分子)の量を求めることができる。

【0110】また、標識された特定分子を用いて、これと試料中の特定分子との競合反応を利用する、いわゆる競合法によっても、試料中の特定分子を測定することが出来る。

【0111】即ち、特定分子を含む試料と標識物質により標識された特定分子(標識特定分子)と、「特定分子の誘電泳動特性を変化させ得る物質」とから、標識特定分子と「特定分子の誘電泳動特性を変化させ得る物質」との標識複合体物質及び特定分子と「特定分子の誘電泳動特性を変化させ得る物質」との複合体物質を形成させ、次いで誘電泳動に付して、該標識特定分子を含む複合体物質と遊離の標識特定分子とを分離し、分離した前記標識複合体物質中の標識特定分子に結合した標識物質の量若しくは遊離の標識特定分子に結合した標識物質の量を、標識物質の性質に応じた測定方法により求め、これらの量に基づいて、試料中の特定分子の量を求めることができる。

【0112】尚、これら上記の方法に於いて、得られた特定分子、特定分子と結合する物質又は標識物質の量に基づいて、試料中の特定分子の量を求めるには、例えば特定分子濃度既知の試料を用いて同様の方法により測定

を行い、得られた特定分子量と、複合体物質中の標識物質の量、複合体物質中の特定分子と結合する物質(又は標識された特定分子と結合する物質)の量、遊離の標識特定分子の標識物質の量又は遊離の特定分子と結合する物質(又は標識された特定分子と結合する物質中の標識物質)の量との関係を示す検量線を、夫々用いて試料中の特定分子の量を算出すればよい。

【0113】また、試料中に濃度既知の検出可能な物質を内部標準として添加し、内部標準として添加した当該物質の量と、複合体物質中の標準物質の量、複合体物質中の特定分子と結合する物質の量(又は標識された特定分子と結合する物質中の標識物質の量)、遊離の標識特定分子中の標識物質の量、又は遊離の特定分子と結合する物質の量(又は遊離の標識された特定分子と結合する物質中の標識物質の量)とを比較することによって、相対的な試料中の特定分子の量の算出が可能となる。また、このようにすることによって、誘電泳動分離デバイス間の誤差を補正することも可能となる。

【0114】上記した如き方法に於いて、検出可能な物質は、誘電泳動力を受ける物質であって、それ自体が何らかの方法により測定(検出)可能であるか、又は標準物質により標識可能なものであるが、通常試料中に存在する成分以外のものであって、且つ測定対象分子に結合し得ないものが一般的である。より具体的には、例えば、上記した如き性質を有する、先に述べた「特定分子」及び「特定分子の誘電泳動特性を変化させ得る物質」等が挙げられる。

【0115】尚、標識物質、標識方法は先に述べた通りである。

【0116】次に、本発明の態様②の分離方法を利用する場合について述べれば以下の如くである。

【0117】尚、本発明の態様②の分離方法を利用した測定方法に於ける測定対象分子(対象分子A)としては、前述した如き分離の対象となり且つ前述した如き溶液に溶解し得るものであって、①該対象分子Aと互いに相互作用を及ぼしあい、複合体物質を形成し得る分子

(分子B)が存在し、該分子Bがそれ自身何らかの方法により測定(検出)し得る性質を有しているか、又は標識物質により標識可能なもの、であるか、②該対象分子Aが標識物質により標識可能であって、該対象分子Aと互いに相互作用を及ぼしあい、標識複合体物質を形成し得る分子(分子B)が存在するもの、であればよい。

【0118】即ち、測定対象分子(対象分子A)と該測定対象分子に特異的に結合する物質(分子B)との相互作用の結果生じる複合体物質(複合体物質2)と、遊離の分子Bとの分離、いわゆるB/F分離を、本発明の態様②の分離方法により行った後、当該複合体物質2、複合体物質2中の対象分子A又は分子B(又は該複合体物質2の分子Bに結合した標識物質)、或いは遊離の分子B(又は遊離の分子Bに結合した標識物質)を測定する

ことにより、試料中の対象分子Aを迅速且つ容易に測定し得る。

【0119】即ち、対象分子Aを含む試料と分子B〔又は標識物質により標識された分子B（標識分子B）〕とを反応させ生じた対象分子Aと分子B（又は標識分子B）との複合体物質2と、遊離の分子B（又は標識分子B）とを、前述した如き本発明の態様②の分離方法により分離する。次いで、分離された該複合体物質2を、該複合体物質2中の分子B（又は該複合体分子中の分子Bに結合した標識物質）の性質に基づいて検出することにより、試料中の対象分子Aの存在の有無を測定することができる。

【0120】更に、例えば以下の如き方法によれば、試料中の対象分子Aの存在を測定し得るのみでなく、試料中の対象分子Aの量を定量的に測定し得る。

【0121】即ち、対象分子Aを含む試料と、分子B〔又は標識物質により標識された分子B（標識分子B）〕とを反応させ、生じた対象分子Aと分子B（又は標識分子B）との複合体物質2と、遊離の分子B（又は遊離の標識分子B）とを、前述した如き本発明の態様②の分離方法により分離する。次いで、分離された該複合体物質2中の分子B（又は該複合体物質2中の分子Bに結合した標識物質）の量、又は遊離の分子B（又は遊離の標識分子Bに結合した標識物質）の量を、分子B又は標識物質の性質に応じた測定方法により求め、これらの量に基づいて、試料中の対象分子Aの量を求めることができる。

【0122】また、標識された対象分子Aを用いて、これと試料中の対象分子Aとの競合反応を利用する、いわゆる競合法によっても、試料中の対象分子Aを測定することが出来る。

【0123】即ち、対象分子Aを含む試料、標識物質により標識された対象分子A（標識対象分子A）及び分子Bを反応させ、標識対象分子Aと分子Bとの標識複合体物質と、対象分子Aと分子Bとの複合体物質を形成させた後、標識複合体物質と、遊離の標識特定分子Aとを、前述した如き本発明の分離方法により分離する。次いで、分離された該標識複合体物質中の標識対象分子Aに結合した標識物質の量又は遊離の標識対象分子Aに結合した標識物質の量を、標識物質の性質に応じた測定方法により求め、これらの量に基づいて、試料中の対象分子Aの量を求めることができる。

【0124】尚、これら上記の方法に於いて、得られた分子B又は標識物質の量に基づいて、試料中の対象分子Aの量を求めるには、例えば対象分子A濃度既知の試料を用いて同様の方法により測定を行い、得られた対象分子A量と、複合体物質中の標識物質の量、複合体物質中の分子B（又は標識物質）の量、遊離の標識対象分子Aの標識物質又は遊離の分子B（又は標識分子B中の標識物質）の量との関係を示す検量線を、夫々用いて試料中の

対象分子Aの量を算出すればよい。

【0125】また、試料中に濃度既知の検出可能な物質を内部標準として添加し、内部標準として添加した当該物質の量と、複合体物質中の標準物質の量、複合体物質中の分子B（又は標識物質）の量、遊離の標識対象分子A中の標識物質の量、又は遊離の分子Bの量（又は標識分子B中の標識物質の量）とを比較することによって、相対的な試料中の特定分子の量の算出が可能となる。また、このようにすることによって、誘電泳動分離デバイス間の誤差を補正することも可能となる。

【0126】上記した如き方法に於いて、検出可能な物質は、誘電泳動力を受ける物質であって、それ自体が何らかの方法により測定（検出）可能であるか、又は標準物質により標識可能なものであるが、通常試料中に存在する成分以外のものであって、且つ測定対象分子に結合し得ないものが一般的である。より具体的には、例えば、上記した如き性質を有する、先に述べた「特定分子」及び「特定分子の誘電泳動特性を変化させ得る物質」等が挙げられる。

【0127】尚、標識物質、標識方法は先に述べた通りである。

【0128】尚、上記方法に於いて、これら対象分子Aに特異的に結合する分子（分子B）は、先に述べた「特定分子と特異的に結合する物質」と同じものである。

【0129】本発明に於いて用いられる標識物質としては、酵素免疫測定法（EIA）、放射免疫測定法（RIA）、蛍光免疫測定法（FIA）、ハイブリダイゼーション法等、通常この分野で用いられるものであればよく、例えばアルカリホスファターゼ（ALP）、 β -ガラクトシダーゼ（ β -Gal）、パーオキシダーゼ（POD）、マイクロパーオキシダーゼ、グルコースオキシダーゼ（GOD）、グルコース-6-リン酸脱水素酵素（G6PDH）、リンゴ酸脱水素酵素、ルシフェラーゼ等の酵素類、例えばクーマシーブリリアントブルーR250、メチルオレンジ等の色素、例えば^{99a}Tc、¹³¹I、¹²⁵I、¹⁴C、³H、³²P、³⁵S、等の放射性同位元素、例えばフルオレセイン、ローダミン、ダンシル、フルオレスカミン、クマリン、ナフチルアミン或はこれらの誘導体、ユウロピウム（Eu）等の蛍光性物質、例えばルシフェリン、イソルミノール、ルミノール、ビス(2,4,6-トリフロロフェニル)オキサレート等の発光性物質、例えばフェノール、ナフトール、アントラセン或はこれらの誘導体等の紫外部に吸収を有する物質、例えば4-アミノ-2,2,6,6-テトラメチルピペリジン-1-オキシド、3-アミノ-2,2,5,5-テトラメチルピロリジン-1-オキシド、2,6-ジ-*tert*-ブチル- α -(3,5-ジ-*tert*-ブチル-4-オキシ-2,5-シクロヘキサジエン-1-イリデン)-*p*-トリルオキシド等のオキシド基を有する化合物に代表されるスピンラベル化剤としての性質を有する物質等が挙げられる。

【0130】標識物質により、対象分子A又は分子Bを

標識するには、通常この分野で用いられる常法、例えば自体公知のEIA、RIA、FIA或いはハイブリダイゼーション法等に於いて一般的に行われている自体公知の標識方法[例えば、医化学実験講座、第8巻、山村雄一監修、第1版、中山書店、1971；図説 蛍光抗体、川生明著、第1版、(株)ソフトサイエンス社、1983；酵素免疫測定法、石川栄治、河合忠、宮井潔編、第3版、医学書院、1987、モレキュラー クローニングア ラボラトリー マニュアル セカンド エディション、J. サムブルック、E. F. フリッシュ、T. マニアティス、コールド スプリング ハーバーラボラトリー プレス等]や、アビジン(又はストレプトアビジン)とビオチンの反応を利用した常法等何れの方法により行ってもよい。

【0131】本発明の測定方法(本発明の第二の方法：態様②)に於いて、対象分子Aと分子B(又は標識分子B)とを反応させて、複合物質2を形成する際の反応条件、或いは、対象分子A、又は標識対象分子A)及び分子Bを反応させて、標識複合物質を形成させる際の反応条件としては、当該複合物質2(又は標識複合物質)が形成されるのを妨げるような条件でなければよく、常法、例えば自体公知のEIA、RIA、FIA或いはハイブリダイゼーション法等に於いて複合物質2(標識複合物質)を形成させる際の反応条件に準じて行えばよい。また、本発明の第一の方法において、特定分子(又は標識特定分子)と該特定分子と結合する物質と「誘電泳動特性を変化させ得る物質」との複合物質1[又は特定分子(又は標識特定分子)と「誘電泳動特性を変化させ得る物質」との複合物質]を形成する際の反応条件、又は、標識特定分子と「誘電泳動特性を変化させ得る物質」との標識複合物質を形成する際の反応条件も、上記反応条件に準じて行えばよい。

【0132】本発明の態様②(第二)の方法に於いて、対象分子Aと分子B(又は標識分子B)とを反応させて、複合物質2を形成する際の分子B(又は標識分子B)の使用濃度としては、対象分子Aの検量限界等により変動するため一概には言えないが、通常、反応液中に於いて、設定された検量限界濃度に相当する対象分子A全てと結合し得る濃度以上、好ましくはその2倍濃度以上、より好ましくは5倍濃度以上が反応液中に存在していることが望ましい。尚、本発明の態様①(第一)の方法における「特定分子」及び「特定分子と結合する物質」(又は標識された「特定分子と結合する物質」)或いは「特定分子の誘電泳動特性を変化させ得る物質」の使用濃度もこの条件に準じて設定すればよい。

【0133】また、本発明の態様②(第二)の方法に於いて、対象分子A、標識対象分子A及び分子Bを反応させて、標識複合物質を形成させる際の標識対象分子Aの使用濃度及び分子Bの使用濃度は、対象分子Aの検量限界や測定感度等をどの程度に設定するかにより適宜設

定すればよいが、標識分子Aの使用濃度は、少なくとも反応液中に存在する分子B全てと結合し得る濃度以上である。尚、本発明の態様①(第一)の方法における「標識特定分子」及び「特定分子と結合する物質」(又は標識された「特定分子と結合する物質」)の使用濃度もこの条件に準じて設定すればよい。

【0134】本発明の態様②(第二)の方法に於いて、反応時のpHや温度は、対象分子Aと分子Bの性質により異なるため一概には言えないが、複合物質2(又は標識複合物質)が形成されるのを妨げない範囲であればよく、pHは、通常2~10、好ましくは5~9であり、温度は、通常0~90℃、好ましくは20~80℃である。また、反応時間は、複合物質2(又は標識複合物質)が形成されるのに要する時間が、対象分子Aと分子Bの性質により異なるので、夫々の性質に応じ、通常数秒乃至数時間適宜反応させればよい。本発明の態様①(第一)の方法に於ける、反応時のpHや温度及び反応時間についても、上記に準じて行えばよい。

【0135】本発明の測定方法に於いて、分離された複合物質2中の分子B(又は該複合物質2中の分子Bに結合した標識物質)、遊離の分子B(又は遊離の標識分子Bに結合した標識物質)、複合物質1中の特定分子に結合する物質(又は該複合物質1中の特定分子に結合する物質に結合した標識物質)、遊離の特定分子に結合する物質(又は遊離の標識された特定分子に結合する物質)、標識複合物質中の標識対象分子Aに結合した標識物質、遊離の標識対象分子Aに結合した標識物質、標識複合物質中の標識特定分子に結合した標識物質、又は遊離の標識特定分子に結合した標識物質を測定するには、これらの種類に応じて夫々所定の方法に従って行えばよい。例えば、その性質が酵素活性の場合にはEIAやハイブリダイゼーション法等の常法、例えば「酵素免疫測定法、蛋白質 核酸 酵素別冊 No.31、北川常廣・南原利夫・辻章夫・石川栄治編集、51~63頁、共立出版(株)、1987年9月10日発行」等に記載された方法に準じて測定を行えばよく、検出物質が放射性物質の場合にはRIAやハイブリダイゼーション法等の常法に従い、該放射性物質の出す放射線の種類及び強さに応じて液浸型GMカウンター、液体シンチレーションカウンター、井戸型シンチレーションカウンター等の測定機器を適宜選択して使用し、測定を行えばよい(例えば医化学実験講座、第8巻、山村雄一監修、第1版、中山書店、1971、生化学実験講座2 トレーサー実験法下、竹村彰祐、本庶佑、501~525頁、(株)東京化学同人、1977年2月25日発行等参照。)。また、その性質が蛍光性の場合には蛍光光度計や共焦点レーザー顕微鏡等の測定機器を用いるFIAやハイブリダイゼーション法等の常法、例えば「図説 蛍光抗体、川生明著、第1版、(株)ソフトサイエンス社、1983」、「生化学実験講座2 核酸の化学III、実吉峯郎、299~318頁、(株)東京

化学同人、1977年12月15日発行等に記載された方法に準じて測定を行えばよく、その性質が発光性の場合にはフ
ォトンカウンター等の測定機器を用いる常法、例えば
「酵素免疫測定法、蛋白質 核酸 酵素 別冊 No.31、北
川常廣・南原利夫・辻章夫・石川榮治編集、252～263
頁、共立出版（株）、1987年9月10日発行」等に記載さ
れた方法に準じて測定を行えばよい。更に、その性質が
紫外部に吸収を有する性質の場合には分光光度計等の測
定機器を用いる常法によって測定を行えばよく、その性
質が発色性の場合には分光光度計や顕微鏡等の測定機器
を用いる常法によって測定を行えばよい。また、検出物
質がスピンの性質を有する物質の場合には電子スピン共
鳴装置を用いる常法、例えば「酵素免疫測定法、蛋白質
核酸 酵素 別冊 No.31、北川 常廣・南原利夫・辻章夫
・石川榮治編集、264～271頁、共立出版（株）、1987年
9月10日発行」等に記載された方法に準じて夫々測定を
行えばよい。

【0136】また、本発明の測定方法に於いて、前述し
た如き本発明の分離方法により分離された各分子を測定
するには、例えば、電極の特定部分（電界の強い領域又
は／及び電界の弱い領域）に於いて、複合体分子若しく
は複合体物質又は／及び遊離の分子B若しくは遊離の
「特定分子と結合する物質」が分離・捕集されているか
否かを、複合体物質2中の分子B（又は該複合体物質2
中の分子Bに結合した標識物質）、遊離の分子B（又は
遊離の標識分子Bに結合した標識物質）、複合体物質1
中の特定分子に結合する物質（又は該複合体物質1中
の特定分子に結合する物質に結合した標識物質）、又は遊
離の特定分子に結合する物質（又は遊離の標識された特
定分子に結合する物質）を直接観察することにより測定
してもよい。尚、この場合、分子B、特定分子又は標識
物質は、放射性、蛍光性、発光性、発色性、スピンの性
質等を有するものが好ましい。

【0137】また、例えば前述した如き電極基板からの
流出液をそのまま検出部に導き、流出液中の、複合体物
質2中の分子B（又は該複合体物質2中の分子Bに結合
した標識物質）、遊離の分子B（又は遊離の標識分子B
に結合した標識物質）、複合体物質1中の特定分子に結
合する物質（又は該複合体物質1中の特定分子に結合す
る物質に結合した標識物質）、遊離の特定分子に結合す
る物質（又は遊離の標識された特定分子に結合する物
質）、標識複合体物質中の標識対象分子Aに結合した標
識物質、遊離の標識対象分子Aに結合した標識物質、標
識複合体物質中の標識特定分子に結合した標識物質、又
は遊離の標識特定分子に結合した標識物質を直接測定し
ても、また、検出部を有する電極基板を用いて、同様に
測定してもよい。尚、これらの方法によれば、測定がよ
り迅速に行える点で有利である。

【0138】この場合に、分子B、特定分子と結合する
物質、特定分子又は標識物質が有している、何らかの方

法により測定（検出）し得る性質が、例えば酵素活性で
あれば、電極基板の電極の下流末端と検出部との間に、
酵素活性測定用の試薬を添加し流出液と反応させる、反
応部を設ける必要がある。該反応部に於いて用いられる
酵素活性測定用の試薬は、常法、例えば「酵素免疫測定
法、蛋白質 核酸 酵素別冊 No.31、北川常廣・南原利夫
・辻章夫・石川 榮治編集、51～63頁、共立出版
（株）、1987年9月10日発行」等に記載された方法に準
じて調製したものを用いても、市販されている臨床検査
用キットの試薬を適宜選択して利用してもよい。また、
分子B又は標識物質の性質が酵素活性以外の場合に於い
ても、検出感度を増加させる目的等で所定の試薬を添
加、反応させるために、電極基板の電極の下流末端と検
出部との間に適当な反応部を設けることは任意である。

【0139】尚、上記2つの測定方法の内、後述の方
法、即ち、電極上で分離した後、夫々の分子を検出部分
に導く方法に於いては、例えば溶出溶液の流速、溶出流
路形状、検出部に移動中の各分子の溶出溶液への拡散等
の影響により、分離効率が低下したり、一旦分離した各
分子の検出感度が低下する等する可能性がある。そのた
め、単に特定の分子を検出するだけであれば、前述の方
法、即ち、電極上で分離した後、直接電極上を観察して
分離された各分子を観察するという方法の方が、上記
した如き拡散等の影響により生じる諸問題を解決でき、
しかも分離された各分子を検出部分に導く必要がないの
で分離から検出までの時間を短縮できる、等の点で有利
である。また、この方法は、電極基板上で反応、分離、
検出が行えるため、反応部分、分離部分、検出部分を一
体化できるので基板の省スペース化にもつながり、更に
は、溶出用の溶液を送流させる必要がなくなるため検出
装置自体の小型化も望める等の点でも有利である。

【0140】本発明の測定方法は、本発明の分離方法を
利用する以外は、上記した如き自体公知の方法に準じて
実施すればよく、使用される試薬類もこれら自体公知の
方法に準じて適宜選択すればよい。

【0141】上記本発明の実施に使用する試薬類等を誘
電泳動用測定キットとしておくと、上記本発明の方法を
実施するのに好都合である。

【0142】具体的には、本発明の誘電泳動用測定キッ
トは、「特定分子と結合する物質」と「特定分子の誘電
泳動特性を変化させ得る物質」とからなり、これらの物
質が試料中の「特定分子」と複合体物質を形成し得る物
質を含むものである。また、「標識物質により標識され
た特定分子」と「特定分子と結合する物質」と「特定分
子の誘電泳動特性を変化させ得る物質」とからなり、こ
れらの物質が試料中の「特定分子」と複合体物質を形成
し得る物質を含むものである。

【0143】上記キットに於いて、「特定分子と結合す
る物質」、「特定分子の誘電泳動特性を変化させ得る物
質」及び「標識物質により標識された特定分子」の好ま

しい態様及び具体例は、先に述べた通りであるが、「特定分子の誘電泳動特性を変化させ得る物質」としては、好ましくは「特定分子」と「特定分子と結合する物質」のいずれか若しくは双方と結合する物質である。また、上記誘電泳動測定キットに、更に、誘電泳動装置を組み合わせても良い。

【0144】尚、これら以外、上記した如き通常この分野で用いられる試薬類や特定分子又は対象分子Aからなる標準品等を含んでいてもよい。

【0145】本発明の測定方法を、特定の遺伝子配列を検出するためのハイブリダイゼーション法に用いる場合を例に取り、以下により具体的に説明する。

【0146】即ち、まず、検出したい遺伝子配列と相補的な配列を持ち、且つ標識物質で標識された適当な長さのヌクレオチドプローブと、変性1本鎖化された未知の遺伝子を、適当な緩衝液中で混合・反応させてアニーリングさせ、該ヌクレオチドプローブと変性1本鎖化未知遺伝子との複合体を形成させる。次いで、得られた反応液を、前述した如き誘電泳動力を利用した本発明の分離方法に供し、該複合体と遊離のヌクレオチドプローブとを分離する。分離後、該複合体中の標識物質を、上記した如き方法により測定すれば、該未知遺伝子がヌクレオチドプローブと相補的な配列を含むのか否か、即ち、ヌクレオチドプローブと相補的な配列の存在の有無を測定することができる。

【0147】上記した如き方法に於いて、ヌクレオチドプローブや緩衝液等は、自体公知の方法に準じて適宜選択すればよい。また、ヌクレオチドプローブの調製方法、変性1本鎖化遺伝子の調製方法及びアニーリング条件等は、自体公知の方法に準じて実施すればよい。

【0148】以下に実施例、参考例及び実験例を挙げ、本発明を更に具体的に説明するが、本発明はこれらにより何等限定されるものではない。

【0149】

【実施例】参考例1 誘電泳動電極基板の作製
最小ギャップ $7\mu\text{m}$ 、電極ピッチ $20\mu\text{m}$ 、電極数2016 (1008対)の多段電極列を設計し、それに基づいて、電極作製のフォトマスクを作製した。

【0150】即ち、アルミ蒸着し、レジストを塗布したガラス基板に、電子ビーム描画装置にて上記設計通りの電極パターンを描画した後、レジストを現像し、アルミをエッチングすることによってフォトマスクを作製した。

【0151】電極基板の作製は、図解フォトファブ리케이션、橋本貴夫著、総合電子出版、(1985)に記載の方法に準じて以下の如く行った。

【0152】即ち、上記の如くして作製したフォトマスクと、レジストを塗布したアルミ蒸着ガラス基板を密着させたのち、水銀ランプで電極パターンを露光した。露光後の電極用ガラス基板はレジストの現像、アルミ面の

エッチングに続き、アルミ面に残ったレジストを除去することによって電極基板を作製した。アルミ表面は電気化学的に活性であり、希釈したフォトレジストをスピニングコートすることによって、厚さ 5nm の有機薄膜コーティングを施した。

【0153】図4に、作製した電極基板の模式図を、また、図5に電極の模式図を夫々示す。尚、図4に於いて1は電極を示す。

【0154】参考例2 流路を有する電極基板の作製
不均一交流電界中に分子を移動させることによる分子の分離を行うため、参考例1で作製した電極基板上にシリコンゴムを用いて流路を作製した。

【0155】電極上に分子が溶解した溶液を送流するためのシリコンゴム流路は、深さ $25\mu\text{m}$ 、幅 $400\mu\text{m}$ で、電極基板上の電極が配置されている領域を通るように設計した。

【0156】作製は、図解フォトファブ리케이션、橋本貴夫著、総合電子出版、1985に記載の方法に準じて行った。まず、ガラス板上に厚さ $25\mu\text{m}$ のシート状ネガレジストを貼り付け、流路作製用に設計したフォトマスクを用いて露光した後、ネガレジストの現像を行った。このネガレジスト基板を鋳型として未硬化のシリコンゴムを流し込んだ後、硬化させることによって電極が配置されている部分に高さ $25\mu\text{m}$ の凹面を持つシリコンゴムを作製した。

【0157】電極基板とシリコンゴム流路を、電極基板上の電極が配置されている領域にシリコンゴム凹面がどのように2液硬化型シリコンゴムで接着し、流路上流部に、溶液注入用のシリンジを差し込み、該電極基板に、電極上を分子が溶解している溶液を送流させる装置を付加した。

【0158】図6に、作製した流路を有する電極基板の模式図を、また、図7に、そのa-a'断面の模式図を夫々示す。尚、図6に於いて、1は電極を示し、矢印は2種以上の分子が溶解した溶液が移動する方向を示す。

【0159】実施例1 誘電泳動クロマトグラフィー装置(Field-Flow fractionation装置)を用いたビオチン分子の検出

誘電泳動分離向上物質として λ DNAを用いてビオチン分子を λ DNAに結合させたビオチン化 λ DNAに、フルオレセイン標識した抗ビオチン抗体を混合して抗原抗体反応を行った後、誘電泳動クロマトグラフィー装置を用いてビオチン分子の定量検出を行った。

【0160】(試料) フォトビオチンラベリングキット(ニッポンジーン社)を用い、添付の作製手順にしたがって、 λ DNAにビオチンを結合させたビオチン化 λ DNAを作製後、次表1に示すような割合で各種成分を 50mM PBS (pH7.5) 中で混合し、抗原抗体反応を行なった。また、各種試料の全 λ DNA濃度は、ビオチン濃度 128nM サンプル(試料番号5)のビオチン化 λ DNA濃度である 0.32nM に

なるように、ビオチン化されていないλ DNAを加えることによって調製を行った。

【0161】

【表1】

試料番号	ビオチン濃度	フルオレセイン標識抗ビオチン抗体
1	0 nM	5.7 nM
2	0.8 nM	5.7 nM
3	1.6 nM	5.7 nM
4	3.2 nM	5.7 nM
5	12.8 nM	5.7 nM

上記抗原抗体反応後、分子量5万の限外ろ過フィルターを用いて媒質を2.5mM炭酸緩衝液 (pH10) に置換して試料とした。

【0162】 (操作) 上記反応溶液を、参考例2で作製した流路を有する電極基板に、マイクロシリンジポンプ (株) アイシス製、KSD100) を用いてサンプル導入口から流速800 μm/secで送流した。印加する電界は周波数1 MHzで、電界強度 (=印加電圧: 最小ギャップ7 μmで定義) は0.9MV/mを用いた。

【0163】 当該電極基板上的のサンプル導入口から、上記分子試料を夫々導入し、導入後30秒〜80秒まで所定の電界を印加して流路出口付近での蛍光量を測定した。 *

$$\text{捕集率}\% = \frac{(\text{電界印加していない時の蛍光量} - \text{電界印加した蛍光量})}{\text{電界印加していない時の蛍光量}} \times 100$$

(結果) 図8にその結果を示す。この実験で用いた電界強度0.9MV/mにおけるそれぞれの分子の捕集率はλ DNAで約100%、Fluorescein標識抗ビオチン抗体では0%であった。ビオチン濃度0pMの時、Fluorescein標識抗ビオチン抗体が認識するビオチン化λ DNA分子がないため、電極に標識抗体がトラップされず捕集率はほぼ0%を示している。ビオチン化λ DNAを添加した場合、Fluorescein標識抗ビオチン抗体がビオチンと抗原抗体反応によって結合するため、電極にトラップされたビオチン化λ DNAと共に複合体形成した標識抗体も電極上にトラップされることとなる。よって、ここで示される捕集率は試料に含まれる全標識抗ビオチン抗体の内、ビオチン化λ DNAに結合した抗体の割合を示しているといえる。ここでビオチン濃度0〜3.2nMにおいてはビオチン濃度の上昇に比例して捕集率が上昇しており、抗原を定量的に検出しているといえる。また、ビオチン濃度を3.2nM以上添加した試料では捕集率の上昇が殆ど見られず約30%程度であった。この理由として、今回用いたFluorescein標識抗ビオチン抗体の抗体価が低く、ビオチンに結合し得る抗体が全抗体の内30%程度しかなかったからではないかと考えている。

【0168】 現在まで誘電泳動クロマトグラフィーによるビオチン-フルオレセイン標識抗ビオチン抗体複合体と未反応のフルオレセイン標識抗ビオチン抗体の分離は、複合体と未反応の抗体との間に誘電泳動分離に十分な大きさの差がないことから不可能であり、ビオチンの複

* 【0164】 尚、測定は、共焦点レーザー顕微鏡 (オリンパス工業(株)製、LSM-GB200) を用いて流路出口付近での流路部分の蛍光画像を約5秒毎に取り込み、全ピクセルの輝度値の総和により測定した (以下、単に蛍光量と呼ぶ)。尚、当該測定では、完全な共焦点像を用いると、流路の深さ方向に蛍光強度の分布があった場合、正確な結果が得られないため、レーザー顕微鏡のフォトマル側のオリフィスを全開にし、深さ方向の蛍光も積分して観察できるようにした。

10 【0165】 捕集率は、以下の式1から算出した。

【0166】 即ち、当該測定に於いて、蛍光標識された分子試料はシリンジポンプにより電極構造上を移動するので、電界を印加しない場合、電極出口で測定される蛍光量は入口での蛍光量に等しいが、電界を印加し、分子が誘電泳動力によって電極に引き付けられれば蛍光量は低下する。従って、この蛍光量の低下分を電極に捕集された分子の量とみなし、元の分子の総量を100とした時の電極部分に引き付けられた分子の量を示すものとした。

20 【0167】

【式1】

$$\text{捕集率}\% = \frac{(\text{電界印加していない時の蛍光量} - \text{電界印加した蛍光量})}{\text{電界印加していない時の蛍光量}} \times 100$$

合体を検出することは出来なかった。上記の結果は、分離向上物質を適用することにより、今まで検出出来なかった分子を誘電泳動クロマトグラフィーにより定量検出することを可能にし得ることを示している。

30 【0169】 実施例2 抗体結合ラテックスビーズを分離向上物質として用いたαフェトプロテイン (AFP) の検出

抗αフェトプロテイン (AFP) 抗体A4-4を吸着させたラテックスビーズに、AFPを反応させ、更にA4-4とはエピトープを異にするフルオレセイン標識抗AFP抗体WA1 F a b' を反応させた複合体を形成させた後、この複合体と複合体を形成していないフルオレセイン標識抗AFP抗体WA1を電極上にて分離することによってAFPの検出を行った。

40 【0170】 2-1 バッファ中AFPの検出

(試薬)

抗AFP抗体結合ラテックスビーズの作製: 自製の抗AFP抗体A4-4 1.2mgと直径120nmラテックスビーズ (積水化学工業 (株) 試薬用ラテックスN-100) 10mgをクエン酸 (pH3) 溶液中で混合した後、遠心分離によってビーズを沈殿として回収した。回収したビーズを2.5% BSA溶液に懸濁させることによってラテックス表面のブロッキングを行い抗AFP抗体A4-4を吸着させたラテックスビーズの作製を行った。これにより、1mg ラテックスビーズに123 μgの抗AFP抗体A4-4の吸着したラテックスビーズを作製した。

【0171】フルオレセイン標識抗AFP抗体WA1 Fab' の作製：抗AFP抗体WA1 40mgをペプシン消化した後、2-アミノエタノール（和光純薬（株）にて還元し、15mgのFab' を作製した。15mgの抗AFP抗体WA1 Fab' と150 μ gのフルオレセインイソチオシアネート（和光純薬工業（株）社）を10mlの炭酸緩衝液（pH9）溶液中で混合した後、NAP-25カラム（アマシャムファルマシアバイオテク社）を用いてフルオレセイン標識抗AFP抗体WA1 Fab' を作製した。

【0172】反応：次表2に示すように各種成分を50mM PBS（pH7.5）中で混合し、室温2時間放置することによって抗原抗体反応を行なった。

【0173】

【表2】

試料番号	抗AFP抗体A4-4 結合ラテックス	AFP	フルオレセイン標識抗AFP FWA1 Fab' 抗体
1	0.10%	0 μ M	0.70 μ M
2	0.10%	0.09 μ M	0.70 μ M
3	0.10%	0.18 μ M	0.70 μ M
4	0.10%	0.35 μ M	0.70 μ M

抗原抗体反応後、この溶液を蒸留水で100倍に希釈して誘電泳動分離を行った。

【0174】（操作）上記の溶液20 μ lを参考例1記載の誘電泳動電極に滴下して22mm角のカバーガラスで覆い、電界印加前と電界印加中の蛍光画像を共焦点レーザー顕微鏡を用いて取りこんだ。印加電界は周波数100kHz、電界強度1.4MV/mとした。

【0175】蛍光画像の解析は画像解析ソフトScion Imageを用いて行った。電界印加前及び電界印加中の蛍光画像の色調階調を平均化した後、電界印加中の画像から電界印加前の画像の色調を引く事によって、電界印加によって蛍光が増加した部分のみを表示した。蛍光増加した部分のデンストグラムを取ることによって蛍光増加量を画像出力濃度値としてあらわした。

【0176】（結果）電極上での誘電泳動の結果ビーズは負の誘電泳動力を受けるため電界強度の低い領域に移動し、未反応のフルオレセイン標識抗AFP抗体WA1 Fab' を含む他の生体分子は正の誘電泳動を受けて電界強度の高い領域に移動することによって、抗AFP抗体結合ラテックスビーズ - AFP - フルオレセイン標識抗AFP抗体WA1 Fab' 複合体と未反応のフルオレセイン標識抗AFP抗体WA1 Fab' を電極上で分離することができた。

【0177】図9はAFP0.35 μ M添加時の電極上での電界印加前と電界印加中のレーザー顕微鏡から取りこんだ蛍光画像である。AFPが存在するサンプルでは電界印加時に負の誘電泳動力によってアルミ電極上に蛍光が集まっているが、AFP無添加サンプルでは電界印加前と電界印加中の画像に変化は見られない。この画像をScion Imageを用いて処理し、蛍光増加したバンド部分のデンストグラムを取り、蛍光増加量を画像出力濃度値としてあらわした。図10はAFP濃度と蛍光増加量の関係を示した

ものである。

【0178】図10の結果から、AFP添加濃度と画像出力濃度値に良好なDose responseが見られ、AFPの定量検出が可能となることが分った。

【0179】2-2 血清中のAFPの検出（試薬）2-1と同じ試薬を用いた。

【0180】反応：前記表2に示すように各種成分をAFPの存在しない正常血清を用いて調製した後、室温2時間放置することによって抗原抗体反応を行なった。

【0181】抗原抗体反応後、この溶液を蒸留水で100倍希釈して誘電泳動分離を行った。

【0182】（操作）2-1と同様の操作を行った。

【0183】（結果）図11にその結果を示す。図11から、AFP存在範囲内で良好な定量性が得られているといえる。このことから、サンプルを血清にしても誘電泳動に大きな影響を与えず血清中の目的タンパクの検出が行えることが分った。

【0184】以上の結果から、ラテックスビーズのように負の誘電泳動を示す物質を分離向上物質として用いることによって、正の誘電泳動を示す生体成分を誘電泳動電極上で分離することができ、現在まで誘電泳動では不可能であったタンパク分子レベルの定量的な分離検出が可能となった。

【0185】実施例3 プローブDNA結合ラテックスビーズを分離向上物質として用いた λ DNAの検出（試料）

2kbDNAプローブ結合ラテックスビーズの作製：プローブDNAを固定化するストレプトアビジンビーズを作製するためにCarbodiimide Kit for Carboxylated Microparticles (Polysciences社製)を用いて直径2 μ mのカルボキシレートラテックスビーズ (PolyScience社製) にストレプトアビジンを固定化した。プローブDNAとしては、5' ビオチン標識した5'-CTATGACTGTACGCCACTGTCC-3' プライマー及び、5'-CAATCACCACCCAGAAAACAATG-3' プライマーを用いて λ DNAのほぼ中間の2kbの配列をPCRによって増幅したものをを用い、これをストレプトアビジン固定化ビーズと反応させることによって、2kb DNA結合ラテックスビーズを作製した。

【0186】作製した2kb DNA結合ラテックスビーズを0.3N NaOHで室温5分静置して2kbDNAを変性1本鎖化し、遠心分離によってビーズを沈殿させた後、再度ビーズを0.3N NaOH溶液に懸濁させた。最終濃度0.3NになるようにHCl溶液を添加することによって中和を行い2kb DNAプローブ結合ラテックスビーズとした。

【0187】 λ DNA及びT7DNAの標識と変性1本鎖化： λ DNA及び λ DNAと異なる配列を有するT7DNAをLabel IT Nucleic Acid Labeling Kitを用いて夫々フルオレセイン（緑色蛍光）およびCy3（モレキュラープローブ社製：赤色蛍光）標識した。標識されたDNAは0.3N NaOHで室温5分静置することによって変性1本鎖化した後、最終濃度0.3

NになるようにHCl溶液を添加することによって中和を行った。

【0188】ハイブリダイゼーション反応：SSCバッファ中に0.05% (w/v)の2kb DNAプローブ結合ラテックスビーズに最終濃度20 μ g/ml濃度になるように標識1本鎖化 λ DNA及びT7DNAを添加し、68°C18時間ハイブリダイゼーション反応を行なった。ハイブリダイゼーション反応後のサンプル溶液は蒸留水にて100倍希釈後、誘電泳動分離を行った。

(操作) 実施例2の2-1と同様の操作を行った。但し、この時の電界は周波数3MHz、電界強度0.9MV/mとした。

(結果) 図12にその結果を示す。

【0189】ハイブリダイゼーション後の溶液を蛍光顕微鏡観察したところ λ DNA標識を行ったCy3の蛍光のみがビーズ上に観察された。この溶液を誘電泳動電極上に滴下した後電界印加したところ、ラテックスビーズが負の誘電泳動力を受けて電界強度の低い領域に移動するため、2kb DNAプローブ結合ビーズに結合したCy3標識 λ DNAの蛍光が電界強度の低い領域に観察され、2kb DNAプローブ結合ビーズに結合していないフルオレセイン標識T7 DNAの蛍光は正の誘電泳動によって電界強度の高い領域に移動するため、電極エッジ部分に観察された。即ち、ラテックスビーズを誘電泳動分離向上物質として用いることによって、多数の分子種の中から特定のDNA分子を分離検出出来ることが証明された。

【0190】以上の結果より誘電泳動分離向上物質が物質検出のための誘電泳動分離に有用である事がわかる。

【0191】実験例1 電極上に於ける分子の観察

(1) DNA分子の観察

ハンドブック・オブ・フルオレッセント・プローブス・アンド・リサーチ・ケミカルズ、リチャード P. ホーランド、シックス・エディション、モレキュラー・プローブ社、(1996)に記載の方法に準じて、蛍光試薬YO-PR0-1 (モレキュラー・プローブ社製商品名) で標識した λ DNA (48.5kb、2本鎖DNA) 0.001mgを含有する超純水溶液1ml、及び常法により短鎖DNAとして合成時に末端を蛍光色素フルオロセインにより標識したオリゴヌクレオチド (22 base、1本鎖DNA：自製品) 0.002mgを含有する超純水溶液1mlを、夫々DNA試料として用いた。

【0192】参考例1で作製した電極基板上で、DNA分子が誘電泳動されるか否かを調べるため、上記DNA試料 (標識 λ DNA又は標識オリゴヌクレオチド) を夫々当該電極基板上に10 μ l滴下し、電極に周波数1MHzの交流電圧を徐々に印加し、蛍光顕微鏡下でDNA試料の蛍光を観察した。

【0193】その結果、電極と電極の最小ギャップ間の電界強度が500KV/m付近から λ DNAが誘電泳動によって強電界部分に集まり始めるのが観察されたが、この電界強度では、オリゴヌクレオチドが誘電泳動によって強電界部分に集合する様子は観察されなかった。

【0194】(2) タンパク分子の観察

ジャーナル・オブ・バイオケミストリー、H. マエダ、65、777、(1969)に記載の方法に準じて、蛍光試薬FITC (フルオレセインイソチオシアネート、和光純薬工業 (株) 製) で標識したIgM (分子量約900kDa) 0.1mg含有する超純水溶液、及びジャーナル・オブ・バイオケミストリー、H. マエダ、65、777、(1969)に記載の方法に準じて、蛍光試薬TRITC (テトラメチルローダミンイソチオシアネート、和光純薬工業 (株) 製) で標識したBSA (分子量約65kDa) 0.1mgを含有する超純水溶液を、夫々タンパク試料として用いた。

【0195】当該電極上で、タンパク分子が誘電泳動されるか否かを調べるため、上記タンパク試料 (標識IgM又は標識BSA) を夫々電極基板上に10 μ l滴下し、電極に周波数1MHzの交流電圧を徐々に印加し、蛍光顕微鏡下でタンパク試料の蛍光を観察した。

【0196】その結果、電極と電極の最小ギャップ間の電界強度が1.0MV/m付近からFITC標識IgMが電界の強い部分に集まり始めるのが観察されたが、この電界強度では、TRITC標識したBSAは誘電泳動によって強電界部分に集合する様子は殆ど観察されなかった。

【0197】実験例2 流路を有する電極基板を用いた分子の分析

(試料) 実験例1で用いた標識 λ DNA溶液及び標識オリゴヌクレオチド溶液を分子試料とした。

【0198】(操作) 上記分子溶液を、参考例2で作製した流路を有する電極基板に、マイクロシリンジポンプ ((株) アイシス製、KSD100) を用いてサンプル導入口から流速800 μ m/secで送流した。印加する電界は周波数1MHzで、電界強度 (=印加電圧：最小ギャップ7 μ mで定義) は数百k～数MV/mを用いた。

【0199】当該電極基板上のサンプル導入口から、上記分子試料 (標識 λ DNA 10 μ g/ml又は標識オリゴヌクレオチド 0.56pg/ml) を夫々導入し、導入後30秒～80秒まで所定の電界を印加して流路出口付近での蛍光量を測定した。

【0200】尚、測定は、共焦点レーザー顕微鏡 (オリンパス工業 (株) 製、LSM-GB200) を用いて流路出口付近での流路部分の蛍光画像を約5秒毎に取り込み、全ピクセルの輝度値の総和により測定した (以下、単に蛍光量と呼ぶ。)。尚、当該測定では、完全な共焦点像を用いると、流路の深さ方向に蛍光強度の分布があった場合、正確な結果が得られないため、レーザー顕微鏡のフォトマル側のオリフィスを全開にし、深さ方向の蛍光も積分して観察できるようにした。

【0201】捕集率は、前記式1から算出した。

【0202】即ち、当該測定に於いて、蛍光標識された分子試料はシリンジポンプにより電極構造上を移動するので、電界を印加しない場合、電極出口で測定される蛍光量は入口での蛍光量に等しいが、電界を印加し、分

子が誘電泳動力によって電極に引き付けられれば蛍光量は低下する。従って、この蛍光量の低下分を電極に捕集された分子の量とみなし、元の分子の総量を100とした時の電極部分に引き付けられた分子の量を示すものとした。

【0203】（結果）標識?DNA溶液を用いて、電界強度0.60MV/m又は1.04MV/mを印加した場合の流路出口での蛍光量の時間変化を図13に、また、標識オリゴヌクレオチド溶液を用いて、電界強度1.4MV/mを印加した場合の流路出口での蛍光量の時間変化を図14に夫々示す。尚、図13に於いて、—○—は、電界強度0.60MV/mを印加した場合の結果を、また、—●—は、電界強度1.04MV/mを印加した場合の結果を夫々示す。

【0204】図13から明らかなように、標識?DNA溶液を用いて、電界強度1.04MV/mを印加した場合には、電界が十分に強く、全ての?DNAが電極に捕集されるため、流路出口での蛍光量は、ほぼ0にまで低下することが判る。尚、80秒後に一時的に蛍光量が増加するのは、電界を切ったために、それまで電極部分に蓄積されていたDNA分子が放出されるため、一時的に初期状態よりも大きな蛍光量を示すようになるからであり、捕集されていたDNAが流出し終わるともとの蛍光量に戻っている。また、標識?DNA溶液を用いて、電界強度0.60MV/mを印加した場合も、同様の傾向がみられるが、電界印加時（30秒～80秒の間）で蛍光量が0にはならないこと、換言すれば、電界強度が十分でないため、完全にDNAが捕集されていないことが判る。尚、実験例1では、電界強度0.5MV/mでλDNAは強電界領域に強く捕集されていたが、本実験では流路内の流れによる抗力が加わるため電極上で同様の分子の捕集能を得ようとした場合、流れのないときよりもより強い電界強度が必要となることが判る。

【0205】また、図14から明らかなように、標識オリゴヌクレオチド溶液を用いて、電界強度1.4MV/mを印加した場合には、蛍光量の低下が全く見られないこと、即ち、当該電界強度では、当該オリゴヌクレオチドが全く捕集されることが判る。

【0206】以上の結果から、λDNAとオリゴヌクレオチドとを分離できることが示唆された。

【0207】実施例4 溶液中のDNA分子の分離 λDNA（48.5kb、2本鎖DNA）及びオリゴヌクレオチド（22 base、1本鎖DNA）が溶解した溶液から、夫々の成分の分離を行った。

【0208】（試料）蛍光試薬YO-PRO-1で標識したλDNA（48.5kb、2本鎖DNA）5μg/mlと、短鎖DNAとして合成時に末端を蛍光色素フルオロセインにより標識したオリゴヌクレオチド（22 base、1本鎖DNA）2.3pg/mlとが、互いに等しい蛍光量を発することを、予め蛍光強度測定により確認した。この結果に基づいて、次表3に示すように、標識オリゴヌクレオチド及び標識λDNAを所定濃度含有する超純水溶液を夫々試料とした。

【0209】

【表3】

試料番号	混合比 オリゴヌクレオチド:λDNA	標識オリゴヌクレオチド濃度	標識λDNA濃度
1	0:1	0pg/ml	10μg/ml
2	1:1	2.3pg/ml	5μg/ml
3	5:1	2.3pg/ml	1μg/ml
4	1:0	2.3pg/ml	0μg/ml

【0210】（操作）試料を、参考例2で作製した流路を有する電極基板に、マイクロシリンジポンプ（株）アイシス製、KSD100）を用いてサンプル導入口から流速800μm/secで送流した。印加する電界は周波数1MHzで、電界強度0.86MV/m又は1.02MV/mを用い、試料導入後30秒～80秒まで所定の電界を印加して流路出口付近での標識λDNAの蛍光量を測定した。尚、測定及び捕集率は、実験例2と同様に求めた。

【0211】（結果）結果を図15に示す。尚、図15に於いて、—○—は、標識オリゴヌクレオチドとλDNAとの混合比が0:1の試料を用いた結果を、—□—は標識オリゴヌクレオチドとλDNAとの混合比が1:1の試料を用いた結果を、—+—は、標識オリゴヌクレオチドとλDNAとの混合比が5:1の試料を用いた結果を、また、—×—は、標識オリゴヌクレオチドとλDNAとの混合比が1:0の試料を用いた結果を夫々示す。

【0212】本実施例に於いて、全ての?DNAが捕集され、オリゴヌクレオチドが全く捕集されない場合を考えると、捕集率は、試料全体の蛍光量に占める?DNAに由来する蛍光量の割合に等しくなる。即ち、試料1（標識オリゴヌクレオチドとλDNAとの混合比が0:1の試料）では捕集率が100%、試料2（標識オリゴヌクレオチドとλDNAとの混合比が1:1の試料）では1/(1+1)=50%、試料3（標識オリゴヌクレオチドとλDNAとの混合比が5:1の試料）では1/(1+5)=16.7%、試料4（標識オリゴヌクレオチドとλDNAとの混合比が1:0の試料）では0となるはずである。

【0213】図15の結果から、電界強度0.86MV/mを印加した場合、?DNAの捕集率（試料1）は53%であり、オリゴヌクレオチド（試料4）は全く捕集されることが判る。また、試料2（?DNA:オリゴヌクレオチド=1:1のサンプル）で約半分の20%強、試料3（?DNA:オリゴヌクレオチド=1:5のサンプル）で10%弱の捕集率が得られており、試料1の捕集率53%から計算される理論値（試料2:53%÷1/(1+1)=26.5%、試料3:53%÷1/(1+5)=8.8%）とほぼ一致していることが判る。

【0214】また、電界強度1.02MV/mを印加した場合、?DNAのみ（試料1）では100%の捕集率、オリゴヌクレオチドのみ（試料4）ではほとんど捕集されることが判る。また、試料2では捕集率が60%、試料3では約20%となり、上記の理論値50%、16.7%とほぼ一致していることが判る。このことから、本発明の方法により、?DNAとオ

リゴヌクレオチドとを、数十秒という短時間で分離し得ることが判る。

【0215】以上の結果から、分離したい分子と、共存する分子との組み合わせにより、適切な電界強度を選択することによって、2種以上の分子を分離することができるようになることが判る。

【0216】実施例 5 溶液中のタンパク分子の分離 IgM (分子量約900kDa) 及びBSA (分子量約65kDa) が溶解した溶液から、夫々の成分の分離を行った。

【0217】(試料) 蛍光試薬FITCで標識した Ig M (分子量約900kDa) 0.1mg/ml及び、蛍光試薬TRITCで標識したBSA (分子量約65kDa) 0.1mg/mlを含有する超純水溶液を試料とした。

【0218】(操作) 流速を400 μ m/sec、印加する電界強度を1.42MV/m、1.78MV/m又は2.14MV/mとした以外は、実施例 1と同様にして、標識 Ig M及び標識BSAの蛍光量を同時に測定し夫々の捕集率を求めた。

【0219】(結果) 結果を図16に示す。尚、図16に於いて、—○—は、標識IgMの捕集率を、また、—●—は、標識BSAの捕集率を夫々示す。

【0220】図16の結果から明らかなように、Ig M、BSAともに電界強度を上昇させるにしたがって捕集率が上昇し、2.14MV/mの電界強度で Ig Mでは捕集率約68.5%、BSAでは捕集率38%となり、明らかにその分子量の違いによって捕集率に違いが見られることが判る。

【0221】尚、今回用いた電界強度では完全にタンパ*

試料 番号	ビオチン標識 λ DNA濃度	フルオレセイン標識 抗ビオチン抗体濃度	未標識DNA濃度
1	0 μ g/ml	21 μ g/ml	10 μ g/ml
2	2.5 μ g/ml	21 μ g/ml	7.5 μ g/ml
3	5 μ g/ml	21 μ g/ml	5 μ g/ml
4	10 μ g/ml	21 μ g/ml	0 μ g/ml

【0226】(操作) 電界強度を1.07MV/mとして実施例2と同様の操作を行い、複合体分子中のフルオレセイン標識抗ビオチン抗体及び遊離のフルオレセイン標識抗ビオチン抗体の蛍光量を測定し、複合体分子の捕集率を求めた。

【0227】(結果) 結果を図17に示す。図17の結果から明らかなように、複合体分子の捕集率が、ビオチン λ DNA濃度10 μ g/mlでは捕集率36%、5 μ g/mlでは捕集率25%、2.5 μ g/mlでは捕集率8.9%、0 μ g/mlでは捕集率6%となり、ビオチン標識 λ DNAの濃度低下とともにその捕集率も低下することが判る。また、 λ DNAを100%捕集するのに十分な誘電泳動条件において、試料1のビオチン標識されていない λ DNAを添加した場合の捕集率が6%であるのに対し、試料2、3、4のビオチン標識 λ DNAを添加したものでは有意にそれよりも高い捕集率を示したことから、フルオロセイン標識抗ビオチン抗体とビオチン標識 λ DNAの抗原抗体反応による複合体分子と、ビオチン標識 λ DNAに結合していない遊離のフルオレセ

* ク分子を捕集することはできなかったが、タンパク分子の違いにより捕集率に有意差が見られたことから、分離電極部分をさらに延長することによって、Ig MとBSAとの分離が可能になることが容易に予測できる。これによりタンパク分子レベルの大きさの違いによっても本発明の方法により分離が可能であることが示唆される。

【0222】実施例 6 抗原抗体反応後のB/F分離 ビオチン標識した λ DNAとフルオレセイン標識した抗ビオチン抗体を混合して抗原抗体反応を行った溶液から、ビオチン標識 λ DNA—フルオレセイン標識抗ビオチン抗体複合体分子とビオチン標識 λ DNAに結合していない遊離のフルオレセイン標識抗ビオチン抗体の分離を行った。

【0223】(試料) フォトビオチンラベリングキット (ニッポンジーン社製) を用い、添付の作製手順にしたがってビオチン標識 λ DNAを作製後、次表4に示すような比率で各種成分を50mM PBS (pH7.5) 中で混合し、抗原抗体反応を行わせた。抗原抗体反応後、分子量5万の限外ろ過フィルターを用いて媒質を2.5mM 炭酸緩衝液 (pH10) に置換し、これを試料とした。

【0224】尚、21 μ g/mlのフルオレセイン標識抗ビオチン抗体 (コスモバイオ (株)) 濃度は10 μ g/mlビオチン標識 λ DNA中のビオチンモル数と等しい量である。

【0225】

【表4】

イン標識抗ビオチン抗体の分離が、ある程度の濃度依存性を持って行えることが判る。

【0228】

【発明の効果】以上述べた如く、本発明の第一の方法によれば、分離向上物質を含む複合体物質を形成させるといふ従来行われていなかった方法によって、従来分離し得なかった溶液中に溶解する2種以上の分子を誘電泳動力によって分離することに初めて成功したものであり、それ故極めて画期的な発明である。

【0229】また本発明の第二の方法は、従来行われていなかった強電界強度の誘電泳動力を利用して、従来分離し得なかった溶液中に溶解する2種以上の分子を、相互に分離することに初めて成功したものである。

【0230】上記本発明によれば、従来誘電泳動力によって分離し得なかった2種以上の分子、例えばDNAやタンパク等の生体成分分子が溶解している溶液から、夫々の分子を迅速且つ容易に分離し得る。

【図面の簡単な説明】

【図1】誘電泳動の原理を示す図である。

【図2】本発明に使用する電極の具体例を示す図である。

【図3】本発明に使用する流路を有する電極基板の一例を示す図である。

【図4】参考例1で作製した誘電泳動電極基板の模式図である。

【図5】参考例1で作製した電極の模式図である。

【図6】図6は、参考例2で作製した流路を有する電極基板の模式図である。

【図7】図6のa-a'断面の模式図である。

【図8】図8は、実施例1で得た、ビオチン濃度と捕集率との関係を示すグラフである。

【図9】実施例2で得た、電極上での電界印加前と電界印加中のレーザー顕微鏡から取り込んだ蛍光画像を示すものである。

【図10】実施例2で得た、AFP濃度と画像出力濃度との関係を示すグラフである。

【図11】実施例2で得た、血清中のAFP濃度と画像解析濃度との関係を示すグラフである。

【図12】実施例3で得た、電界印加前と電界印加中の電極基板の模式図及び電界印加中の蛍光顕微鏡写真を示すものである。

【図13】実験例2で得た、標識?DNA溶液を用いて実施した流路出口での蛍光量の時間変化を示すグラフである。

【図14】実験例2で得た、標識オリゴヌクレオチド溶液を用いて実施した流路出口での蛍光量の時間変化を*

* 示すグラフである。

【図15】実施例4で得た、電界強度と標識λDNAの捕集率との関係を示すグラフである。

【図16】実施例5で得た、電界強度と標識IgM又は標識BSAの捕集率との関係を示すグラフである。

【図17】実施例6で得た、ビオチン標識λDNA濃度と捕集率との関係を示すグラフである。

【符号の説明】

図3に於いて、矢印は2種以上の分子が溶解した溶液が移動する方向を示す。図4に於いて、1は電極を示す。図6に於いて、1は電極を示し、矢印は2種以上の分子が溶解した溶液が移動する方向を示す。図7に於いて、各数字は夫々以下のものを示す。

1：流路

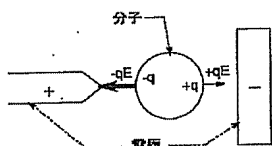
2：ガラス板

3：電極

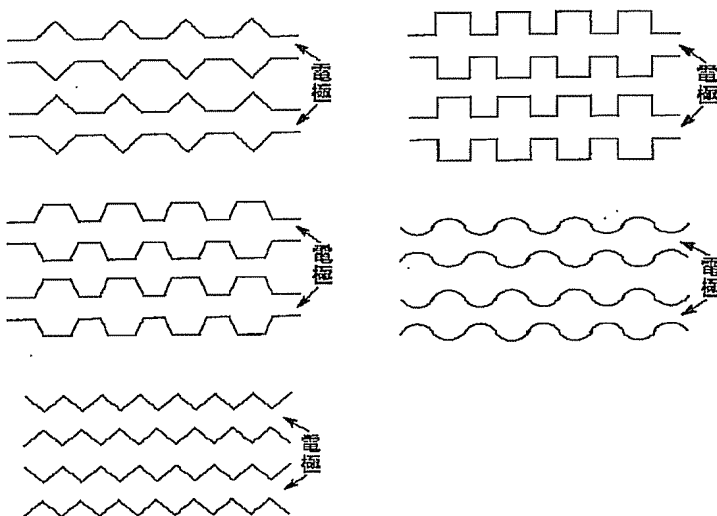
図13に於いて、—○—は、電界強度0.60MV/mを印加した場合の結果を、また、—●—は、電界強度1.04MV/mを印加した場合の結果を夫々示す。図15に於いて、

—○—は、標識オリゴヌクレオチドとλDNAとの混合比が0：1の試料を用いた結果を、—□—は標識オリゴヌクレオチドとλDNAとの混合比が1：1の試料を用いた結果を、—+—は、標識オリゴヌクレオチドとλDNAとの混合比が5：1の試料を用いた結果を、また、—×—は、標識オリゴヌクレオチドとλDNAとの混合比が1：0の試料を用いた結果を夫々示す。図16に於いて、—○—は、標識IgMの捕集率を、また、—●—は、標識BSAの捕集率を夫々示す。

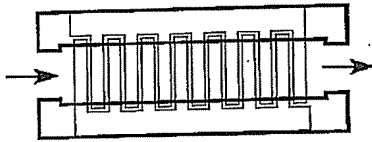
【図1】



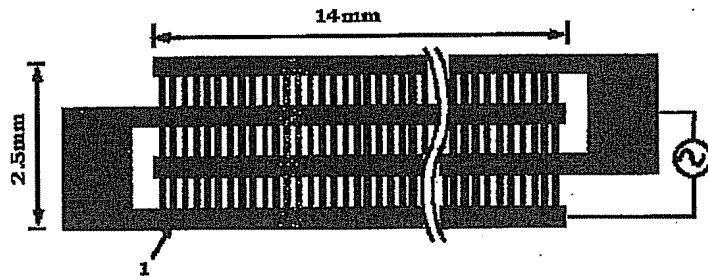
【図2】



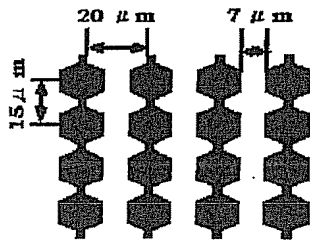
【図3】



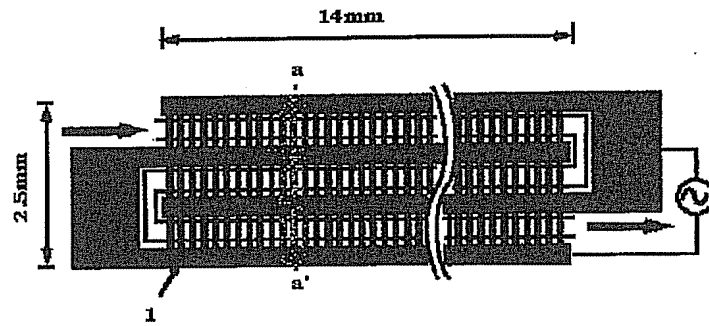
【図4】



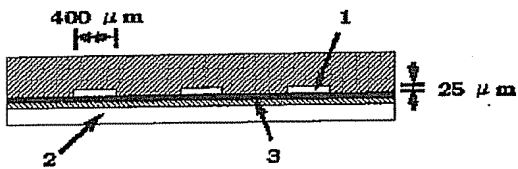
【図5】



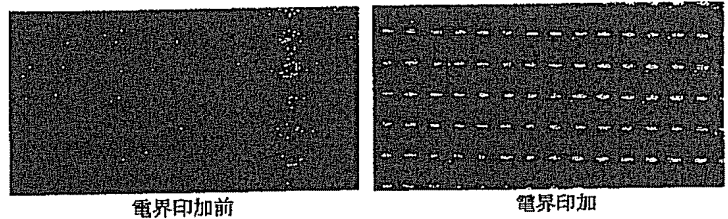
【図6】



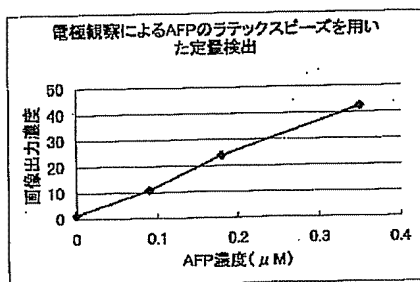
【図7】



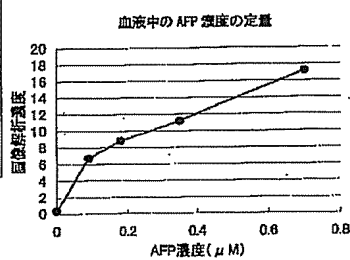
【図9】



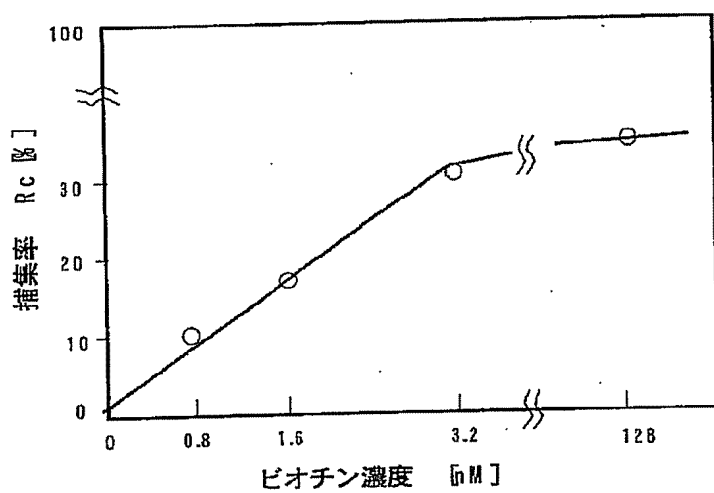
【図10】



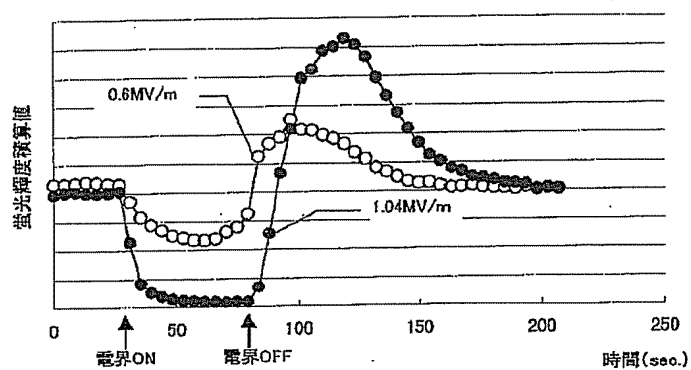
【図11】



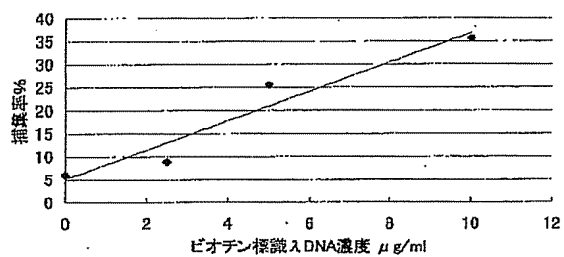
【図8】



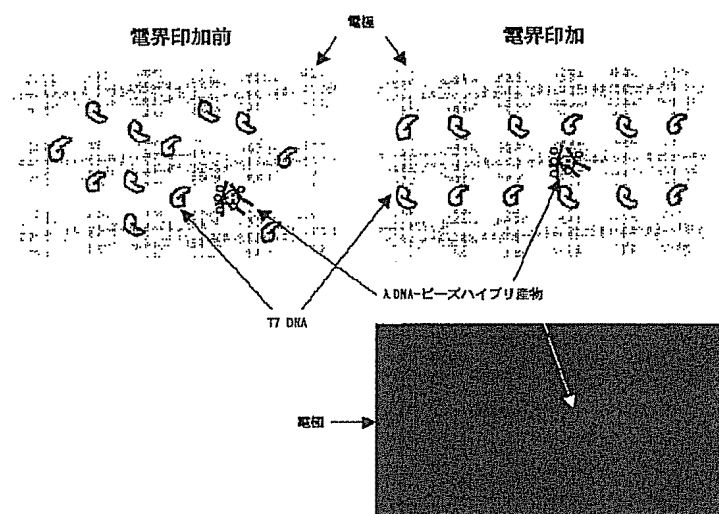
【図13】



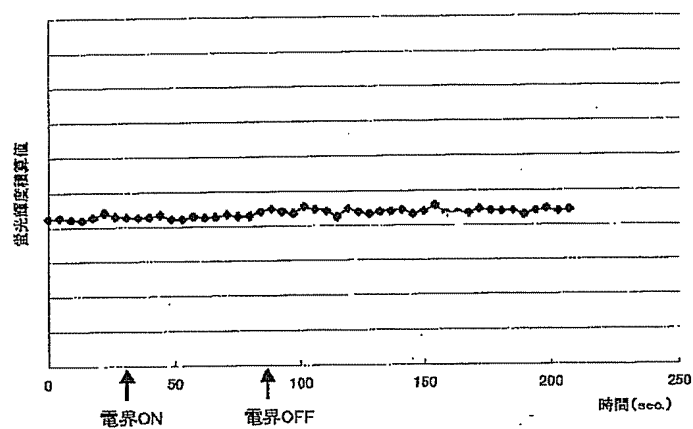
【図17】



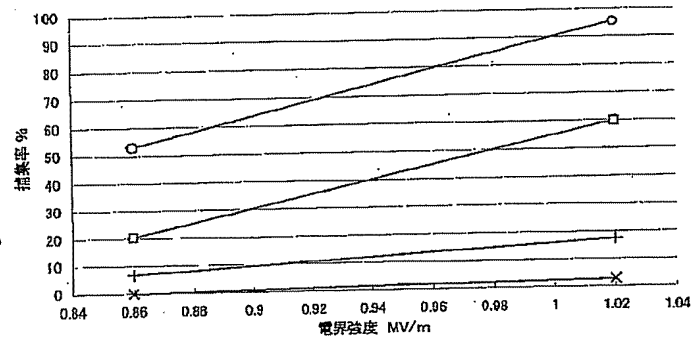
【図12】



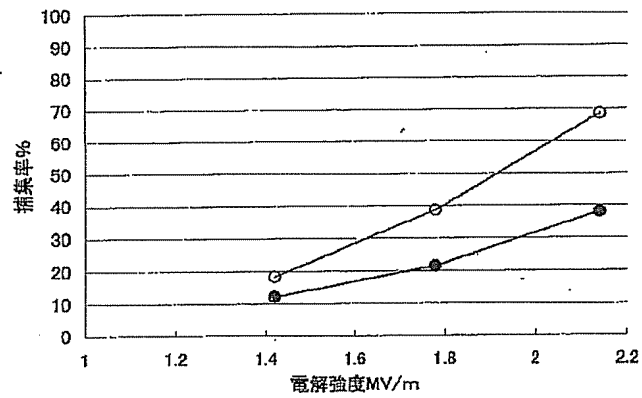
【図14】



【図15】



【図16】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.⁷

G 0 1 N 33/53

33/566

識別記号

F I

G 0 1 N 33/53

33/566

27/26

ターマコード' (参考)

M

3 3 1 A

3 0 1 Z